



TITLE:

マウスおよびラットのコリンアセチル転移酵素遺伝子の転写調節機構に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

三澤, 日出巳

CITATION:

三澤, 日出巳. マウスおよびラットのコリンアセチル転移酵素遺伝子の転写調節機構に関する研究. 京都大学, 1993, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1993-07-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3070377>

RIGHT:

②

マウスおよびラットの
コリンアセチル転移酵素遺伝子の
転写調節機構に関する研究

1993

三澤日出巳

目次

緒言	1
第 1 編 コリンアセチル転移酵素 mRNA の 5' 非翻訳領域の オルタナティブスプライシング	4
第 1 章 ラット脊髄での 5 種の ChAT mRNA の同定および ゲノム DNA のクローニングと構造解析	5
第 2 章 マウス脊髄での 7 種の ChAT mRNA の同定および ゲノム DNA のクローニングと構造解析	17
第 1 編 小括	27
第 2 編 コリンアセチル転移酵素遺伝子のプロモーター領域および エンハンサー領域の同定	28
第 1 章 NS20Y および NG108-15 で発現している ChAT mRNA の解析	29
第 2 章 DNA トランスフェクション法による ChAT の 5' 転写調節領域の解析	31
第 2 編 小括	37
第 3 編 サイクリック AMP によるコリンアセチル転移酵素遺伝子の 転写調節	38
第 3 編 小括	45
結論	46
謝辞	47

緒言

コリンアセチル転移酵素 (acetylCoA:choline O-acetyltransferase; ChAT、EC2.3.1.6) はアセチル CoA とコリンから神経伝達物質アセチルコリン (ACh) を合成する酵素である。ChAT は現在のところ、コリン作動性ニューロンの機能状態を示す最も特異的なマーカーである。この酵素は 1943 年に発見されたが¹⁾、微量かつ高比活性なため 100 万倍以上に精製しない限り純品は得られず、このため酵素タンパク質としての実体およびその活性調節機構は長い間不明であった。ChAT の cDNA は 1986 年に伊藤らにより *Drosophila* から初めて単離された²⁾。哺乳動物の ChAT の cDNA は現在までに、ブタ³⁾、ラット^{4, 5)}、マウス⁶⁾ およびヒト⁶⁾ について報告されている。

ChAT の短期的、長期的活性調節機構についての知見は現在でも極めて乏しい。神経活動により伝達物質の放出が高まると、不足した伝達物質を補充するための生合成がすみやかに高まることが知られているが、AChに関するこのメカニズムはわかっていない。ChAT は種々のタンパク質リン酸化酵素によりリン酸化を受けるとの報告があるが⁷⁾、リン酸化の活性調節に対する寄与は不明である。長期的調節については、1970 年代に神経由来の細胞株や初代培養系で、さまざまな因子や培養条件が ChAT 活性を増加させることが示されている⁸⁾。マウス胎児脊髄の初代培養系で、運動ニューロンは標的細胞である筋細胞との共培養により ChAT 活性が著しく上昇する⁹⁾ ことや、ラット新生仔の上頸部交感神経節の初代培養系で、leukemia inhibitory factor や ciliary neurotrophic factor などが交感神経節細胞の表現型を、アドレナリン作動性からコリン作動性に変換させる^{10, 11)} ことなどが知られている。これらの長期的活性調節には ChAT の転写レベルでの発現調節が関与すると考えられるが、そのメカニズムは不明である。一方、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患でコリン作動性ニューロンの変性、脱落が示されている^{12, 13)}。

特定のコリン作動性ニューロンがどのようにして ACh を伝達物質とする表現型を獲得してゆき、正常時や病態時に ChAT 遺伝子の発現がどの様に制御されているかを解析するためには、ChAT 遺伝子のクローニングとその遺伝子発現機構の解析は必須の課題である。そこで著者は、ラットおよびマウスの ChAT 遺伝子の転写

調節領域を解析し、以下の新知見を得た。

1. ChAT の mRNA には 5' 非翻訳領域の異なる複数の分子種が存在し、これらは 3 カ所のプロモーターからの転写開始とエクソンのオルタナティブスプライシングにより産生されることを明らかにした。
2. 上記のプロモーターのうち、コリン作動性細胞株を用いた DNA トランスフェクション法により、マウスの ChAT 遺伝子の最も主要なプロモーター領域 (M-type promoter) を同定した。また このプロモーターの下流のイントロンにエンハンサー活性があることを発見した。さらに、M-type promoter の発現に神経細胞特異性があることを示した。
3. マウスの ChAT 遺伝子のサイクリック AMP (cAMP) 反応性に関与する領域を同定し、cAMP が ChAT 遺伝子の転写を制御していることを証明した。

以上の知見により、著者のクローニングした遺伝子領域には、ChAT の神経細胞特異的発現と cAMP への反応性を規定する DNA エLEMENTが存在するとの結論に達した。

以下、これらの知見について、3 編に分けて論述する。

なお、本文中ならびに図表中で使用した略語は以下の通りである。

ACh:acetylcholine

8-BrcAMP:8-bromo cyclic AMP

bp:base pair(s)

BSA:bovine serum albumin

cAMP:3',5'-cyclic AMP

CAT:chloramphenicol acetyltransferase

ChAT:choline acetyltransferase

CIA:chloroform & isoamyl alcohol

CRE:cyclic AMP-responsive element

DBcAMP:N⁶,O²-dibutyryl cyclic AMP

DMEM:Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA:ethylenediaminetetraacetic acid

h:hour(s)

kb:kilobase(s)

min:minute(s)

PCR:polymerase chain reaction

5'-RACE:rapid amplification of cDNA 5'-ends

SDS:sodium dodecyl sulfate

TLC:thin layer chromatography

第 1 編

コリンアセチル転移酵素 mRNA の 5' 非翻訳領域の オルタナティブスプライシング

石井らは 1990 年にラットおよびマウス脊髄からそれぞれ 1 種類の ChAT cDNA をクローニングし、その構造を決定した⁶⁾。両者は翻訳領域に高い相同性 (94%) が認められたが、5' 非翻訳領域の -38 bp を境として、その上流の構造は大きく異なっていた (Fig. 1)。また、ブタ³⁾およびヒト⁶⁾の ChAT cDNA の 5' 非翻訳領域はともにマウスと高い相同性が認められた。

Mouse	CTGGGTACTGGCAACTTCGTGGAGGCTCTGCTACAGAACCTAGGTGGCGGGCCCAACCTCTGGTACTGCTGCCACCCCTCCCTGGC	-120
	*** **	
Rat	AAGCCAGGACTCTCAGCTTGTGCAGCACCCCGGAAGGA	
	*** **	
	CCTTCTGGCTCACGAGCCGCTCCAGCCCTGCTTGGTGTGGAACAGTGGCGTTCGGTGGCTAAGAGCCAGGAGAGAGGTCGGCAGCTCTGCTACTC	-20
	* * * * *	
	AGGTGAGCCTTCCTAAGCCTCTACTGACAGCAAGCTGCAGAGGCCCTTGGCGGTGAGACCCAGAGCTTCCAAGCCACTTGTCTACAGCTCTGCTACTC	
	* * * * *	
	TGGATTAGAATCGCTAGG	
	ATG CCT ATC CTG GAA AAG GTC CCC CCA AAG	
	*** **	
	TGGAGCGAGAGTCACTACA	
	ATG CCC ATC CTG GAA AAG GCT CCC CAA AAG	
	Met Pro Ile Leu Glu Lys Val Pro Pro Lys	
	Met Pro Ile Leu Glu Lys Ala Pro Gln Lys	

Fig. 1. Comparison of 5'-noncoding region of choline acetyltransferase cDNAs cloned from spinal cords of mouse (upper) and rat (lower). Asterisks show the nucleotides common to both cDNAs. Coding regions are boxed. An in-frame termination codon upstream of the initiation ATG is underlined.

5' 非翻訳領域はゲノム上のプロモーター領域を同定するために重要であるため、上記の相違が動物種の違いによるものか、もしくは ChAT の mRNA には 5' 非翻訳領域の異なる複数の転写産物が存在するのかを明らかにする必要がある。そこでラットとマウスのそれぞれについて ChAT の 5' 領域を含む clone を効率良く得るため、翻訳領域の一部に相補的なプライマーを用いて cDNA library を作成し、cDNA クローニングを行った。またこの両動物種のゲノム DNA library から 5' 領域を含むゲノム DNA clone を単離し、その構造を解析した。

第 1 章

ラット脊髄での 5 種の ChAT mRNA の同定および ゲノム DNA のクローニングと構造解析

ラット脊髄で、従来知られている種類 (Fig. 1) 以外の ChAT mRNA が発現しているのか否かを明らかにする目的で ChAT の mRNA とゲノム DNA の解析を行った。

実験方法

1. 特異的プライマーを用いた cDNA library の作成

cDNA library 作成のアウトラインを Fig. 2 に示す。

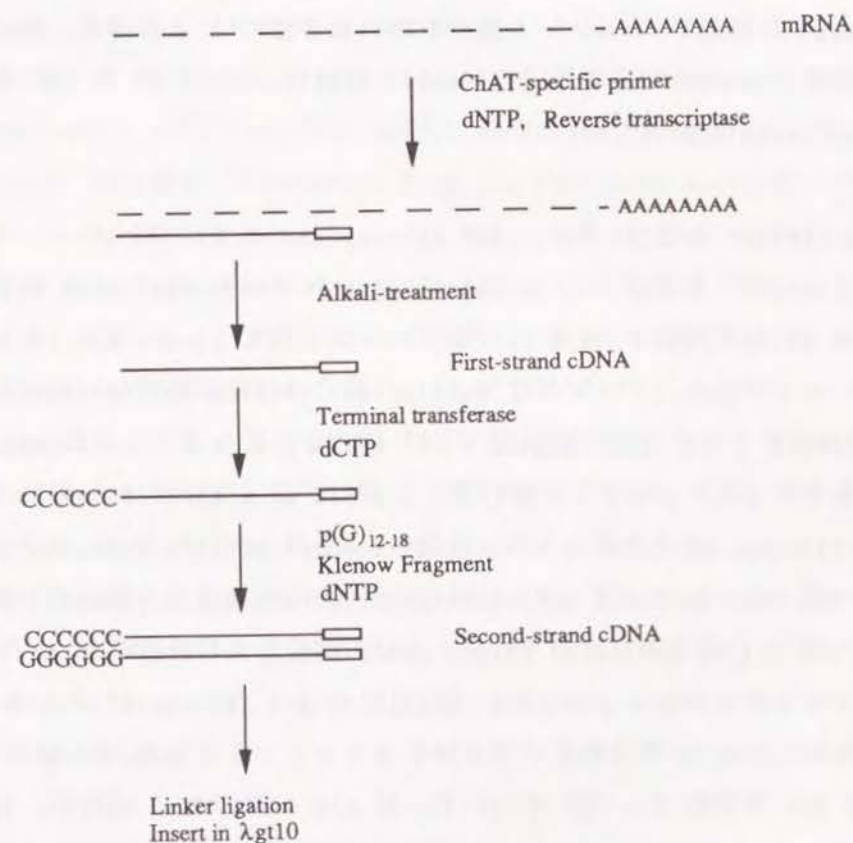


Fig. 2. Construction of cDNA library directed by specific primer.

Wistar ラット脊髄から guanidium thiocyanate 法で total RNA を抽出し、oligo(dT)-cellulose column chromatography¹⁴⁾ により poly(A)⁺RNA を得た。first strand cDNA は poly(A)⁺RNA 20 μ g から rat ChAT cDNA の 639-655 bp に相補的な 17-mer の oligonucleotide と myeloblastosis virus reverse transcriptase を用いて作成し、未反応の nucleotide と primer は Sepharose-CL 4B column により除去した。terminal transferase で first strand cDNA の 3'-end に dC-tail を付加したのち、second strand cDNA は p(dG)₁₂₋₁₈ をプライマーとする Land らの方法¹⁵⁾ により作成した。cDNA の両端に EcoRI/NotI linker を付加後、常法により¹⁶⁾ λ gt10 の EcoRI site に挿入した。

2. ゲノム DNA library の作成

ラットの ゲノム DNA は Wistar ラット脳から SDS と EDTA 存在下に proteinase K 処理し、フェノール抽出を用いる常法¹⁷⁾ により得た。Sau3AI での部分切断後、sucrose density gradient で分画し、10-20 kb の DNA を EMBL 3 の BamHI site に挿入した。

3. cDNA library および ゲノム DNA library のスクリーニング

cDNA library および ゲノム DNA library はラット ChAT cDNA の翻訳領域の N 末部分 (HindIII-SphI、170 bp) をプローブとして plaque hybridization でスクリーニングした。プローブは Multiprime labeling system (Amersham) と [α -³²P]dCTP を用い、比活性 5-10 $\times 10^8$ cpm/ μ g にラベルした。phage DNA はニトロセルロースフィルターに移行後、5 x SSC (1 x SSC: 150 mM NaCl、15 mM sodium citrate, pH 7.0)、5 x Denhardt's solution (1 x Denhardt's: 0.02% BSA、0.02% Ficoll、0.02% polyvinylpyrrolidone)、30% formamide、0.1% SDS および 100 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA を含む溶液中で 42 $^{\circ}$ C で 2 h プレハイブリダイゼーションした。上記溶液に 5 $\times 10^5$ cpm/ml となるようにプローブを加え、42 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後フィルターは 0.1% SDS を含む 2 x SSC 中 42 $^{\circ}$ C、30 min の洗浄を 3 回行い、X線フィルムに露光した。

4. 塩基配列の決定

cDNA clone, ゲノム DNA clone および PCR 産物は制限酵素で切断後、pUC18 にサブクローニングし、dideoxy 法¹⁸⁾ で塩基配列を決定した。

5. polymerase chain reaction (PCR) および PCR 産物のサザンブロット解析

PCR は Chelly らの方法¹⁹⁾ に若干の修正を加えた。

ラット脊髄の poly(A)⁺RNA 20 μ g と特異的プライマー 25 pmol を用い上記の方法で first strand cDNA を作成した。未反応の primer と nucleotide を除去後、cDNA の 1/12 を GeneAmp Kit と Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) を用いて増幅した。反応は 25 pmol の forward primer と 25 pmol の reverse primer を用い 50 μ l の反応液中で 25 サイクルの増幅 (各サイクルは 94 $^{\circ}$ C、40 sec; 65 $^{\circ}$ C、2 min; 72 $^{\circ}$ C、3 min) を行い、最後に 72 $^{\circ}$ C、15 min の伸長反応を追加した。特異的な forward primer は Fig. 3 に示した。共通の reverse primer はラット ChAT cDNA の 139-162 bp に相補的な 24-mer (5'-GCTCTTCCTGAACTGCTCTTCAGG-3')を用いた。PCR 産物は 3% Nusive GTG Agarose gel (FMC Bioproducts) で分離後、GeneScreen Plus (Du Pont-NEN) に移した。プレハイブリダイゼーションは 30% formamide、1 M NaCl、10% dextran sulfate、1% SDS および 150 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA を含む溶液中で 42 $^{\circ}$ C、2 h 行った。プローブは ラット ChAT cDNA の塩基 1-24 bp に相補的な 24-mer (5'-ATGCCCATCCTGGAAAAGGCTCCC-3')を用い、[γ -³²P]ATP で 5'ラベルし、上記溶液に 5 $\times 10^5$ cpm/ml になるように加えて 42 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションした。フィルターは 2 x SSC で室温下、軽く 2 回すすいだのち、0.1% SDS を含む 2 x SSC 中で 45 $^{\circ}$ C、30 min 洗浄し、X線フィルムに露光した。

翻訳領域を増幅するためには 50 pmol の p(dN)₈ を primer として first strand cDNA を作成した。全翻訳領域をオーバーラップするよう 3 つの sub-region (region-1、1-663; region-2、616-1323; region-3、1276-1920)に分け、それぞれを上記の条件で 25 サイクル増幅した。使用した primer は以下の通りである。

region-1: 5'-ATGCCCATCCTGGAAAAGGCTCCC-3'

5'-CAGATCACCTCACTGAGACGGCG-3'

region-2: 5'-GCTTTGGATGTTGTCATTAATTTTC-3'
 5'-TCTCTGGTAAAGCCTGTAGTAAGC-3'
 region-3: 5'-TTCATCCAGGTGGCCCTCCAGCTG-3'
 5'-AGATTGCTTGGCTTGGCTTGGGCC-3'

実験結果

1. 異なる 5' 非翻訳領域をもつラット ChAT cDNA のクローニング

ChAT-specific primer を用いて作成したラット脊髄の cDNA library (1.7 x 10⁶ independent phage) を、以前にラット脊髄からクローニングした ChAT cDNA⁵⁾ の翻訳領域の N 末部分をプローブにしてスクリーニングしたところ、約 200 個の陽性シグナルが得られた。このうち無作意に 29 clone を単離し、その塩基配列を決定した。-38 bp から下流は全ての clone で同一であったが、それより上流の構造で 4 種類に分類された。Fig. 3 に 4 種類の cDNA の塩基配列を、Fig. 4 に各構造の比較および単離した clone の数を示した。

R1-type

R1/R2
 -191 ACGCAGAGGCTGATCTGTTCAGCTGTGCTGCAAGCCAGGACTCTCAGCTTGTGAGCA
 -131 CCCCCGAAGGAAGGTGAGCTTCTTAAGCTCTACTGACAGCAAGCTGCAGAGGCT
 -71 GCCGCGTGAGACCCAGAGCTTCCAAGCCACTTCTACAGCTCTGCTACTGTGAGCGA
 -11 GAGTCACTACAATGCCATCCTGGAAAAGGCTCCCAAAAGATGCTGTAAGGCTTCTA
 M P I L E K A P Q K M P V K A S S
 -50 GCTGGGAGGAGCTGACTTACCTAAATTACAGTGCCCGCGCTGCAGCAAA
 W E E L D L P K L P V P P L Q Q

R2-type

R2
 -254 AGAAAAGTCCAATCTCAACAACGTACCACTATCCCAATCTCAGCTTACTGGCATCTC
 -194 TCTCTGCCAGTCTGTGACGGGAACGGGCTCAGCTGCCATCTAGGGTCAAACTCTG
 -134 CGGAGGACACACACTGGGCCCAACCGAGAGGCTGATCTGTTCAGCTGTGCTGCAAGCC
 -74 AGGACTCTCAGCTTGTGAGCAGCCCCGGAAGGAGCTTACAGCTCTGCTACTCTGGAG
 -14 CGAGAGTCACTACAATGCCATCCTGGAAAAGGCTCCCAAAAGATGCTGTAAGGCTT
 M P I L E K A P Q K M P V K A S
 -47 CTAGCTGGGAGGAGCTGACTTACCTAAATTACAGTGCCCGCGCTGCAGC
 S W E E L D L P K L P V P P L Q Q

M-type

-516 ACGGATGGGACTAAGCGAGTCTGGGGTGGGGCGTGGGCAGACAACGTTCTGCCACCCCT
 -456 TCCCAGAGCCTAAATCTGATGCCAGTGCAGGAATCATGTGGGAAGTATCTAGACAGA
 -396 TTTTTGAAGCAGAAGATGGGAATCGCGCGCAGGCAGAGCATGGGTAGGGGAGCAGT
 -336 GGACTGTGAGGAAGAGAGGAGGAGGGGAAAGGGGAGGGGAAAAGAGAAGAGGGGGA
 -276 GGGAGGAGGATGGGAGGAGTCCAGAGAGGTGTGGCTGGTTTGTCTCGACGTCACTCAGT
 -216 CGGGGGGCTGCTGGGACCTGACAACGTCCTGAGGCTCTACTACAGAACCTAGGCGGC
 -156 GGCCCAACCTCTGACACTGCTGCCACCCCTCTTGTATCTTCTGGCTCACAGAACCCTCT
 -96 CCAGCCTCTCTGGTGTACAGCAGCGCTGGTTTGGCACGGAACAGCCCTGGAGAGCAGT
 -36 CTACAGCTCTGCTACTCTGGAGGAGAGTCACTACAATGCCATCCTGGAAAAGGCTCC
 M P I L E K A P
 25 CAAAAGATGCTGTAAGGCTTCTAGCTGGGAGGAGCTGGACTTACCTAAATTACAGTG
 Q K M P V K A S S W E E L D L P K L P V
 85 CCCCCGCTGCAGCAAA
 P P L Q Q

N1-type

-732 TCACAGGTTCACTCCAGACCTGAGGAGGAGGGGAAGCCCTGAAGCGTCTTTGCTGCTGG
 -672 TAAAAGAACCCAAAGGAGGGCTCTCCCATGGATATTGAGAACACACACACACACAC
 -612 ACACACACTCACACACACACACACACACACAGGATAGACAGACAGACAGACA
 -552 GACAGACAGACAGACAGTCTCTCCCTTCCAAGTCCAGTGTAGCACCTGGAGGTTCACCC
 -492 GAGGGAGCCTGAGGATCTGCCTGGCCTTGGAGGATAGCTGGCACCAGGAATTTGGGTGC
 -432 CAGGACTGGGCTTCTACACAGTGGGAACCTGCTTCTATCTGTCAAGAAAGGGAGCTGT
 -372 TTTCTGCAGAGAAGAGGAGGTAGTCCGCTCTTTAGGGTCTGGGCTGGGACAGTGTTC
 -312 ATTAAGGATTCAGGCTCTTCTGTGAAGACTGAGAGGACACTTACCTGTGGATCCGCTC
 -252 TCCTCAGTCTGAATGGAAAATGGAAGTCACTCAGTCTGGGGCGGCTGTGGGACCTGACA
 -192 ACGTCGCTGAGGCTCTACTACAGAACCTAGGCGGGGCGCAACCTCTGACACTGCTGCC
 -132 ACCCCTCTTGTATCTTCTGGCTCACAGAACCCTCCAGCCCTGCTTGGTGTACAGCAG
 -72 CGCTGGTTCGGCACGGAACAGCCCTGGAGAGCAGTCTACAGCTCTGCTACTCTGGAGCG
 -12 AGAGTCACTACAATGCCATCCTGGAAAAGGCTCCCAAAAGATGCTGTAAGGCTTCT
 M P I L E K A P Q K M P V K A S
 49 AGCTGGGAGGAGCTGACTTACCTAAATTACAGTGCCCGCGCTGCAGCAAA
 S W E E L D L P K L P V P P L Q Q

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of four types of cDNA clones encoding the 5'-region of rat choline acetyltransferase. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction starting with the initiation ATG as number 1. Regions common to the four types of cDNAs are boxed. The regions common to R1 and R2-types, and common to M and N1-types are underlined with dashes and dots, respectively. In-frame termination codons upstream of the initiation ATG are underlined. One letter amino acid notation is used. Only 100 bp of the 5'-coding regions are shown. Horizontal arrows above sequences indicate the synthetic primers used in PCR analysis.

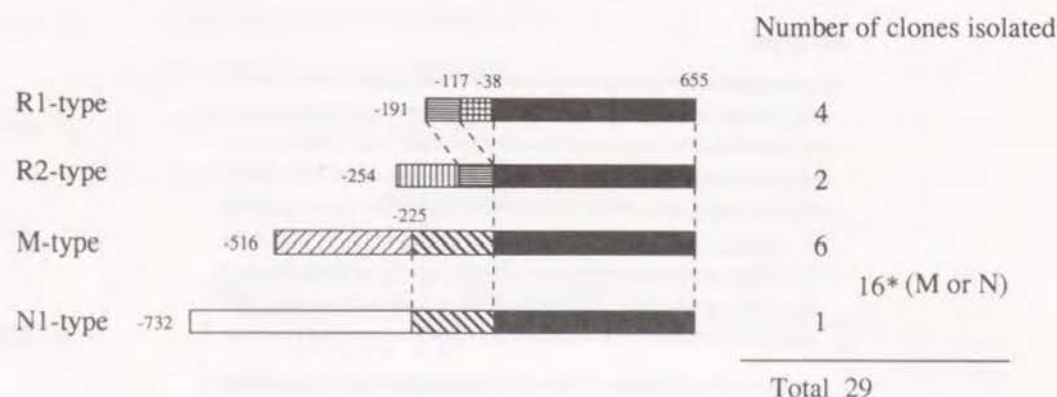


Fig. 4. Comparison of structures of cDNAs and numbers of clones isolated. Nucleotide residues are numbered as shown in Fig. 3. The sixteen clones marked by an asterisk terminated in the common region of M and N1-types.

29 clone のうち 4 clone (R1-type) は以前にラット脊髄から単離した cDNA と同一であったが、5' 側にさらに 69 bp 伸びていた。R2-type の 2 clone は R1-type と共通の 74 bp の領域を持っていたが、その両側が異なっていた。M-type の 6 clone と N1-type の 1 clone は -226 bp より下流は同一であったが、それより上流が異なっていた。M-type と N1-type の共通領域は、マウス⁸⁾、ブタ⁹⁾およびヒト¹⁰⁾の ChAT cDNA と高い相同性があった。5' 末端がこの共通領域内で止まっていたものが、さらに 16 clone あった。Fig. 3 に示したように、R2、M、N1-type の各 cDNA は initiation ATG codon の上流に in-frame で stop codon が確認された。R1-type cDNA の initiation ATG codon (推定) の上流には in-frame の stop codon も ATG codon も認められなかった。

2. ラット ChAT mRNA の 5' 非翻訳領域および翻訳領域の PCR 解析

cDNA クローニングで得られた 4 種の cDNA が実際に発現しているか否かを PCR 法で検討した。

共通の reverse primer と 6 種の forward primer を Fig. 3 と Fig. 5 に示した。R1、N1 および M primer はそれぞれの cDNA の特異的領域に、R2 primer は R2-type cDNA の 5' 末端に配置した。R1/R2 と N1/M primer は、それぞれ R1

と R2-type cDNA および N1 と M-type cDNA の共通領域にとった。ラット脊髄の poly(A)⁺RNA から first strand cDNA を合成し、PCR 法で 25 サイクル増幅した。増幅産物をエチジウムブロマイドを含むアガロースゲルで電気泳動したところ、M および N1/M primer を用いたレーンにのみバンドが認められた。さらに DNA をニトロセルロースフィルターにブロッティングし、³²P でラベルした翻訳領域の oligonucleotide でハイブリダイズした (Fig. 5)。

R1/R2 primer では R1-type mRNA に相当する 354 bp と R2-type mRNA に相当する 275 bp の 2 本のバンドが検出された。R1 primer では予想される 234 bp のバンドが検出された。R2 primer を用いた時、R2-type mRNA に相当する 414 bp の強いシグナルと、さらにその上方に 493 bp の薄いバンドが検出された。このバンドは R1-type mRNA に由来すると考えられ、R1-type mRNA も cDNA として得られている部分の 5' 側にさらに R2-type mRNA と同じ構造を有していることを示している。N1 primer では、N1-type mRNA に相当する 514 bp のバンドが認められるが、その下に 327 bp のバンドも検出された。このバンドを切り出し塩基配列を決定したところ、新たなタイプ (N2-type) であった。N2-type は N1-type の構造のうち N1 と M-type の共通部分 (Fig. 3 の -225 から -39 bp) が欠失した構造をしていた。M および M/N1 primer ではそれぞれ予想される 418 bp と 248 bp のバンドがそれぞれ検出された。

ChAT mRNA の 5' 非翻訳領域で見られたオルタナティブスプライシングが翻訳領域にも見られるか否か PCR 法で検討した。

全翻訳領域をオーバーラップする様に 3 つの subregion に分け、それぞれを PCR 法で 25 サイクル増幅し、アガロースゲルで分離した (Fig. 6)。3 つの subregion とともに cDNA の構造⁸⁾から予想される長さのバンド (lane 1, 663 bp; lane 2, 708 bp; lane 3, 645 bp) のみが検出された。さらに、ニトロセルロースフィルターにブロッティング後 ³²P でラベルした全翻訳領域をプローブとしてハイブリダイゼーションしたが、他のバンドは認められなかった。

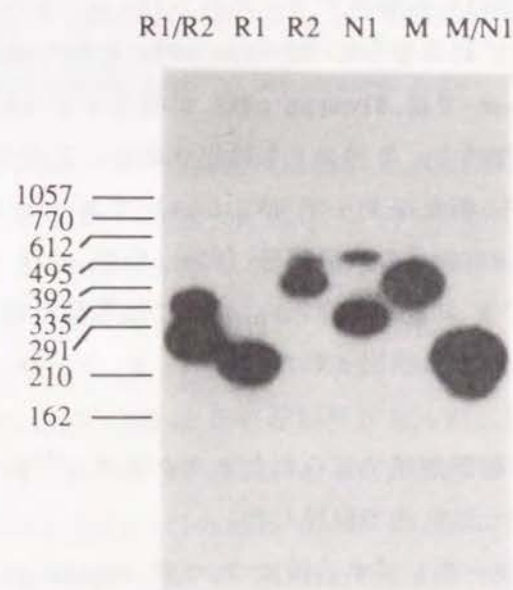
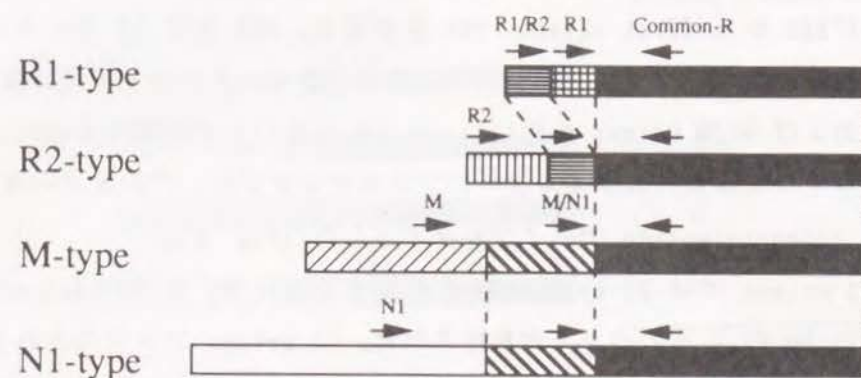


Fig. 5. PCR amplification of 5'-regions of choline acetyltransferase mRNAs from rat spinal cord. Each type of transcript was amplified for 25 cycles using a specific forward primer and a common reverse primer. The amplified products were separated on a 3% agarose gel, transferred to a filter membrane and hybridized with a ^{32}P -labeled oligonucleotide corresponding to the common coding region.

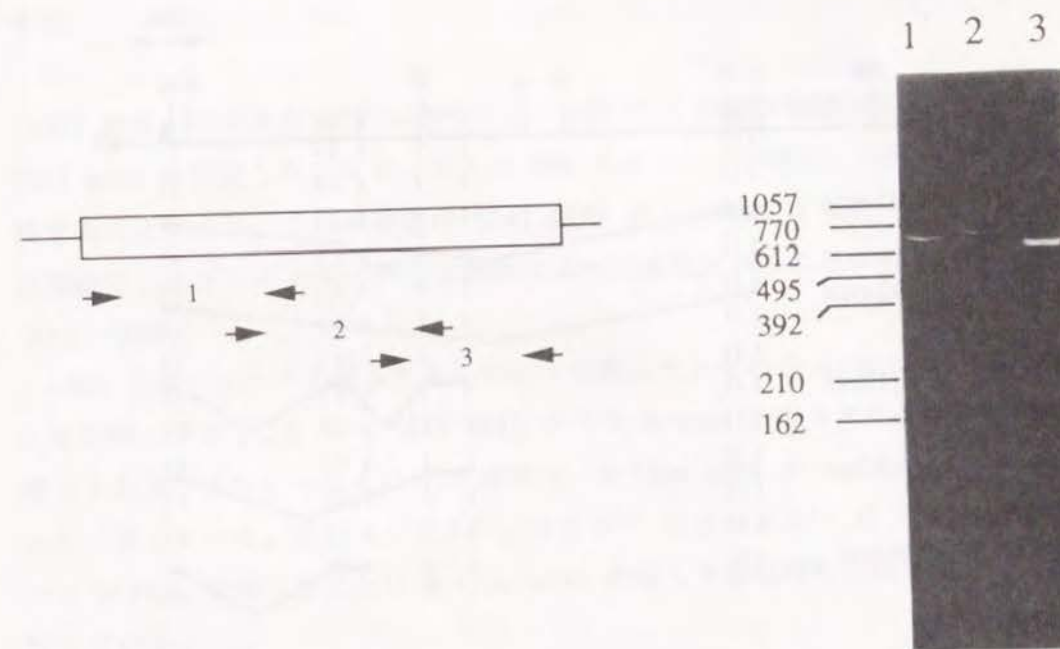
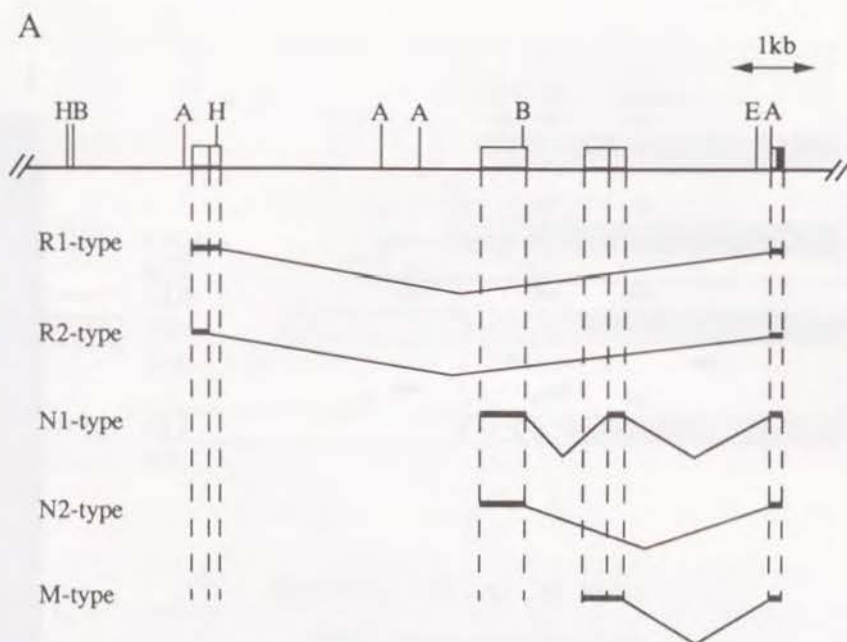


Fig. 6. PCR amplification of coding region of choline acetyltransferase mRNA from rat spinal cord. The whole coding region was divided into 3 subregions (1-663, lane 1; 616-1323, lane 2; 1276-1920, lane 3) and amplified for 25 cycles. The products were separated on a 3% agarose gel containing ethidium bromide.

3. ラット ChAT の 5'領域を含むゲノム DNA のクローニングと構造解析

ラットのゲノム DNA library を作成し、翻訳領域の N 末部分をプローブにしてスクリーニングして 2 クローン (RG7 と RG8) を得た。両者ともに R1、R2、N1 および M primer のすべてにハイブリダイズした。Fig. 7A に制限酵素地図とエクソン-イントロン構造および 5 種の mRNA との関係を図示した。すべてのエクソンとエクソン-イントロンの境界部分の塩基配列を決定した。

Fig. 7B に示す様に、エクソン-イントロンの境界はすべて GT/AG rule²⁰⁾ に合致していた。上記の構造から、R1/R2 と N1/N2-type mRNA はそれぞれエクソンのオルタナティブスプライシングにより産生され、R、N、M-type mRNA はそれぞれ異なるプロモーター領域からの転写開始により産生されることが示された。



B

Type of cDNA	5' donor	3' acceptor
R1	CAAGCCACTTgtgagccac	ctgttcccagGTCTACAGCT
R2	CGGAAGGAAGgtgagccttc	ctgttcccagGTCTACAGCT
N1	AAAATGGAAGgtagatggat	ttgctcgcagTCAGTCAGTC
	TGGAGAGCAGgtgagaagga	ctgttcccagGTCTACAGCT
N2	AAAATGGAAGgtagatggat	ctgttcccagGTCTACAGCT
M	TGGAGAGCAGgtgagaagga	ctgttcccagGTCTACAGCT

Fig. 7. Structure and splicing of the 5'-region of rat choline acetyltransferase gene. A: A map of the 5'-region of choline acetyltransferase gene is shown at the top of the Figure. Open and filled boxes indicate the 5'-noncoding and coding regions of mRNAs, respectively. Restriction sites for AccI (A), BamHI (B), EcoRI (E) and HindIII (H) are shown. A comparison of the structure of choline acetyltransferase gene and the five types of mRNAs is shown below. B: The nucleotide sequences of the gene at exon-intron boundaries of the five types of mRNA species. The sequences of exons are shown in capital letters, and those of introns are in lower case letters.

考察

cDNA クローニングと PCR によりラット脊髄で 5' 非翻訳領域の異なる 5 種の ChAT mRNA を同定した。さらにゲノム DNA をクローニングし、cDNA と構造を比較することにより、これら複数の ChAT mRNA が 3 カ所のプロモーターからの転写開始と、スプライシング部位の選択によって産生されることが明かとなった (Fig. 7AB)。

cDNA クローニングで得られたクローンの数はそれぞれの mRNA の発現量の相対比を反映しており、5 種の ChAT mRNA のうち M-type が最も多く発現していると考えられる。またこのことは PCR 解析で、M-type mRNA のシグナルが最も強いことと一致している。さらに、ブタ³⁾、マウス⁵⁾ およびヒト⁶⁾ の ChAT cDNA がすべて M-type であったことは M-type mRNA が最も主要な転写産物であることを支持している。

R1-type をのぞいた 4 種の cDNA は、ATG codon の上流に in-frame で stop codon が認められた。しかし PCR 解析の結果 (Fig. 5) から、R1-type も上流に R2-type と同じ構造を持っており、この部分に in-frame の stop codon が認められる。したがって 5 種の ChAT mRNA からは同一の ChAT タンパク質が翻訳されると考えられる。5' 非翻訳領域の異なる mRNA の生理的意義は現在のところ不明であるが、mRNA の安定性や翻訳効率に影響する可能性が考えられる。

複数のプロモーターが存在することの意義については以下の可能性が考えられる。

- 1) 1 つのコリン作動性ニューロンが発生・分化の過程でプロモーターを使い分けている。
- 2) コリン作動性ニューロンには、運動ニューロン、交感、副交感神経節前ニューロン、副交感神経節後ニューロンや中枢のコリン作動性ニューロンなど異なる種類が知られているが、それぞれで異なるプロモーターを使っている。
- 3) NGF など幾つかの trophic factor が、特定の神経細胞の ChAT 活性を上昇させることが知られている。この過程において、異なる trophic factor が別々のプロモーターを介して ChAT の転写を制御している。

これらの可能性を解析するには、それぞれの ChAT mRNA に特異的な cRNA プロブを用いる in-situ ハイブリダイゼーションや初代培養系での ChAT mRNA の解析が必要である。この様な解析はコリン作動性ニューロンの発生・分化のメカニズムを解明する上で重要な手がかりになると考えられる。

第 2 章

マウス脊髄での 7 種の ChAT mRNA の同定および ゲノム DNA のクローニングと構造解析

マウス脊髄においても 5' 非翻訳領域の異なる複数の ChAT mRNA が存在するの
か否かを明らかにする目的で第 1 章と同様の解析を行った。またさらに Rapid
Amplification of cDNA 5'-Ends (5'-RACE) 解析により M-type mRNA の発現量
を検討した。

実験方法

第 1 章と同様の方法を用いたが、相違点のみ以下に記す。

1. 特異的プライマーを用いた cDNA library の作成

cDNA library はマウス脊髄の poly(A)⁺RNA 10 μ g と mouse ChAT cDNA の
642-658 bp に相補的な 17-mer の oligonucleotide (Fig. 8、Rev-1) を用いて
作成した。

2. cDNA library およびゲノム DNA library のスクリーニング

cDNA library はマウス ChAT cDNA の HindIII-ScaI 断片 (455 bp) をプロー
ブとしてスクリーニングした。マウスゲノム DNA library (in Charon 28) を
JCRB 遺伝子バンクから得てマウス ChAT cDNA の全長をプローブにしてスクリー
ニングした。

3. Rapid Amplification of cDNA 5'-Ends (5'-RACE)

first strand cDNA はマウス脊髄の poly(A)⁺RNA 10 μ g と M-type エクソン
に相補的な 30-mer oligonucleotide (Fig. 14、RACE-1) を用いて作成し、5' 末端
に dC-tail を付加した。この cDNA の 1/10 を 100 μ l の反応液中で、10 pmol
の (dG)₁₇-adaptor と 25 pmol の adaptor および 25 pmol の M-type エクソン

に相補的な oligonucleotide (Fig. 14、RACE-2) を用いて、Frohman ら²¹⁾ の方法で増幅した。(dG)₁₇-adaptor と adaptor は Sal I と EcoRI site を含み、配列は以下の通りである。

(dG)₁₇-adaptor: 5'-CTGAGAAATTCGTCGACGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3'

adaptor: 5'-CTGAGAATTCGTCGACGTAC-3'

5'-RACE 産物は 0.5% SDS と 5 mM EDTA を含む 200 μ l の反応液中で 200 μ g の Proteinase K で 56 $^{\circ}$ C、30 min 処理し、フェノール抽出、CIA 抽出ののちエタノール沈澱した。沈澱した DNA は 100 μ l の H₂O に溶解し、このうち 2 μ l を 3% アガロースゲルで分離後、ニトロセルロースフィルターに移行した。ハイブリダイゼーションには M-type エクソンに相補的な oligonucleotide (Fig. 14、RACE-3) をプローブとして用いた。

実験結果

1. 異なる 5' 非翻訳領域を持つマウス ChAT cDNA のクローニング

特異的プライマーを用いて作成したマウス脊髄の cDNA library (1.6×10^5 independent phage) を mouse ChAT cDNA の N 末部分をプローブとしてスクリーニングし、約 300 個の陽性シグナルを得た。このうち無作意に 21 clone を単離し塩基配列を決定したところ、2 種に分類された。Fig. 8 に最も長い 5'-end を持つ clone の塩基配列と、各 clone の数を示した。両者は -38 bp から下流は同一であったが、それより上流が異なっていた。M-type mRNA は以前にマウス脊髄から得られた clone と同一であり、さらに 5' 側に 47 bp 伸びていた。R1-type は以前にラット脊髄から得られた cDNA に高い相同性が認められた。M-type cDNA は initiation ATG codon の上流に in-frame で stop codon が認められたが、R1-type cDNA にはなかった。

A. M-Type (19/21 clones)

254 AGAGAGAGGTTGGTCTTGGCTTTGCTTCTCAGTCAGTCAGTCGGGGCGGCTGCTGGGATCTGGCA
 194 ATCTTCCTCGAGAGCTCTGTACAGAACCTAGTGTGGCGGGCCAACTCTGGTACTGTGGC
 134 CACCCTCTCTCTGGCCCTTCTTGCTCAGCAGCCGCCCTCCAGCCCTGCTTGGTGTGGAA
 74 AGTGCCTGTTCTGGTGCCTTAACAGCCAGGAGGACCACTGGCGAGCTCTGCTACTCTGGAT
 -14 TAAGATCGCTAGGATGTCCTACTCGGAAAGGTCCTCCCAAGAGCTGCTCAACGTT
 M P I L E K A V P T K M P V Q A S
 47 CTAGCTCTGAGGAGCTGTGGCACTTACTTAAGTTGCACTGGCCCTCCCACTGCAACCAAC
 S E E E V I D L P K L P V P P L Q T Q T L
 107 TGGCCACCTACCTCTAGTCATGCAACACCTGGTACCTGAAGAGCAGTTCTAGGAAGAGCC
 A T Y I L Q C M Q H K T G T G A G G C A G T T Q A G G C
 167 AGGCATCTTGTGAAGGGCTTGGGGCCCTGGTGGCTGGGTGGAGACCTGCAAGAAAGC
 A I V K A G A G A G G A G A G C A G C A A T T G G G T C T G A E T L Q E K L
 227 TCTTTGGAGACAGGAGAGACAGGCAATTTGGGCTCTCAAGTCTGGCTGAATACATCAT
 I E H Q E K T A N V S E Y W L N D M Y
 287 ATCTAAACACAGCTGGGCTCTGGCAGCAACTCTAGGCTCTGTGTATCTTGTCTGGC
 I N N K L A L P V N S P A V I F A N Q
 347 AGCACTCTCAAGACCAATGACCACTAAGTTTGAACAGCAGCTCACTCTTGGTGTG
 H F Q D T N D Q L R F A A S L I S G V L
 407 TTAGGTACAAAGGCTCTGTGGACGCCAATCCATCCCACTGACTGGCCAGAGGGACG
 S Y X K A L D S Q S I P T D W A K Q G
 467 TCTCAGGACAGCTCTCTGTATGAAGCAAGTACACAGCTCTCTCATCATACGGGCTC
 S G Q P L C M X K Y A A R L S S Y H L P
 527 CTGGCACTACCCAGACCACTGGTGGCCAGGAGACAGTATCTGCTGAGCCCGAGC
 C H T D T T L V A Q K S S I M P E P E H
 587 ATGCTACTGTGGCTCTGTGCAACAGTCTTCTGTCTGGATGTTGTCAATTAATCTTGGC
 V I V A C C N Q F F V L D V V I N F R H
 647 GTCTCAGTGAGC
 L S E

B. R1-Type (2/21 clones)

-223 AAAAAA C T C T C T G G A G C A C A C T G G G C C A A C G C A T A G C T G A T C T G T T C A G C C T G T G C
 -163 C C T G C A A A T C A G C A G C T C A G C G T G T G A G C C T C C C G G A A G G A G G C T G A G C T T C C T A A
 -103 G C C T C T A C T G A C A G C A A A G C T G C A G A G C C T G C T G C G T G A G A C C C A G A G C T T C C A C G C
 -43 C A C T T T C G G A G C T T G C T A C T T G G A T T A G A A T C G C T A G A T A G C C A T T C C T T G G A A A
 M P I L E K K
 18 G T C C C C C A A A G A T G C C T C T A C A A G C T T C T A G C T G T G A G G A G C T G C T G A C T T A C C T A A
 V F P K M F V Q A S S C E E V L D L P A
 -38 G T T C C C A G T C C C C C A C C T C A G C A A C C C T G G C A C C T A C T T C A G T G A C T G C A A C C T
 L F P V P P L T Q T L A T I V L Q C M Q H I
 138 G G T A C T C A G A G A C C T C A G G A A G C A G C C A C T T G T G A A G C T T G T T G G C C C C T G G
 V F E E Q P F R K S Q A I G A V K R F G A P D
 98 T G G C C T G G G T G A G A C C T C A G A A A A G C T T T G G A G A G A C A G G A A G A C A G C A A C C A T T G
 G L G E T L Q E K L I R E Q E A T A N N
 68 G G T C T G A A T A C C T G A A T G A C A T G T A T T A A C A A C C G G C T G C C C T G C C A G C T A A
 V S E Y V L N D M Y I L N N R L A L P V N
 318 C T A G C C T G C T G T A T C T T T G C C G C A C A C T T C C A G A C A C A A T A G A T A G C A A A G
 S S F A V I F A R Q H F G Q T D N D Q L R
 378 G T T T G A C C C A G C C T C A C T T G G T G C T T A G C T A C A A G C T C T C T G T G A C A G C A A T C
 F A A S L I S G V I L Y K A L I D S Q S
 428 C A T T C C A C T A C T G G G C A A G G G C A G C T C T A G C G A C C C T C T G A T A G A G C A G T A
 I P T D N A K G Q L S G P L C M N Q Y
 498 C T A C A G C T C T C T A C T A C C G G T T T C T G G C A C C A G A G A C A C T G A G C C A
 V R L F S S Y R L P G G N T Q D T L V A Q
 558 G A A G A C A G T A T A C G T C T G C C G C C A A G C T G A T C A T G T G G C C T C T G C A A C C A G T T C T T
 R S S I M F E P E R I V A G C N Q P F
 618 T G T C T G G A T T G C T A A T T A A T T C G C C T C T C A G T A G G
 V L D V I I N F R L S E
 R
 Rev-2
 Rev-1
 Rev-3

Fig. 8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of two types of cDNAs encoding the 5'-region of mouse choline acetyltransferase. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction starting with the proposed initiation ATG codon as number 1. Regions common to M and R1-type cDNAs are boxed. An in-frame termination codon upstream of the initiation ATG is underlined. One letter amino acid notation is used. Horizontal arrows above sequences indicate the position of primers used in the construction of the cDNA library and in PCR analysis.

2. マウス ChAT mRNA の 5' 非翻訳領域および翻訳領域の PCR 解析

共通の reverse primer (Rev-2) と ChAT mRNA の各種類に特異的な forward primer (M-1、M-2、R) を Fig. 8 に示した。マウスの cDNA library からはラット脊髄で同定された N1、N2-type cDNA は得られなかったが、クローン化したマウスのゲノム DNA 上の N-type エクソンに相当する領域 (Fig. 12、後述) を同定し、これに相補的な N primer (5'-GGATCCAGGCTCTATCATCTGAGG-3') を作成した。PCR 法で 25 サイクル増幅し、翻訳領域の oligonucleotide をプローブとしてサザンブロッティングで解析した (Fig. 9)。R primer では R1-type mRNA に相当する 300 bp のバンドの他に、220 bp (R2)、488 bp (R3)、409 bp (R4) の 3 本のバンドが認められた。これら新たなバンドを切り出し、pUC18 にサブクロー

ニングして塩基配列を決定した (Fig. 10)。N primer では 2 本のバンドが認められたので、これらの塩基配列も決定した (Fig. 10)。R2、N1、N2-type mRNA はそれぞれ第 1 章で同定したラット ChAT の各転写産物と類似していた。R3 と R4-type mRNA はラットでは得られていない種類であった。M-1 と M-2 primer ではそれぞれ予想される長さのバンドが認められた。M-2 primer は 4 種 (R3、R4、N1 と M) の mRNA を増幅するため、強いシグナルを与えた。7 種の ChAT mRNA のうち R1-type 以外は initiation ATG codon の上流に in-frame で stop codon が確認された。

翻訳領域についても、第 1 章と同様に、全翻訳領域を 3 つの subregion に分けて解析したが、cDNA⁵⁾ から予想される長さのバンドのみが検出された。

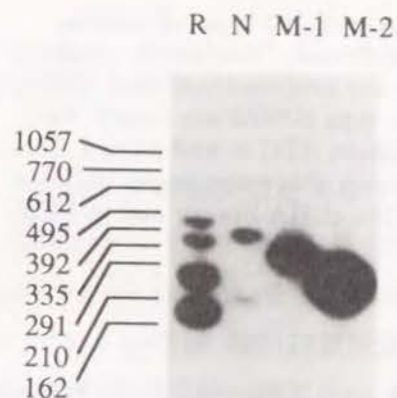


Fig. 9. PCR amplification of the 5'-region of choline acetyltransferase mRNA expressed in mouse spinal cord. Each type of transcript was amplified for 25 cycles using a specific forward primer and a common reverse primer (Rev-2). The products were separated on a 3% agarose gel, and then transferred to a filter membrane and hybridized with a ³²P-labeled oligonucleotide corresponding to the common coding region.

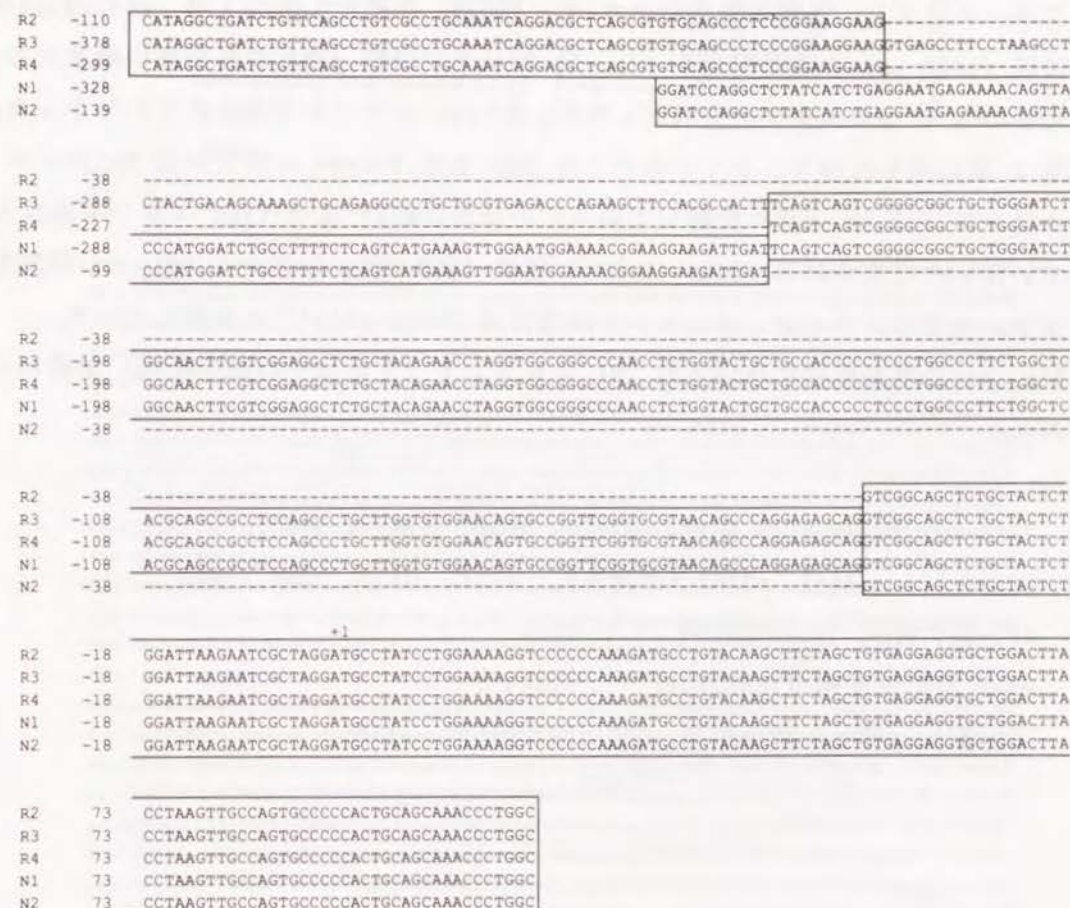


Fig. 10. Nucleotide sequences and alignment of choline acetyltransferase cDNAs from PCR products. Nucleotide residues are numbered as shown in Fig. 8. Sequences are aligned with inserted gaps represented by dashes (-). Identical sequences in each mRNA type are enclosed in boxes.

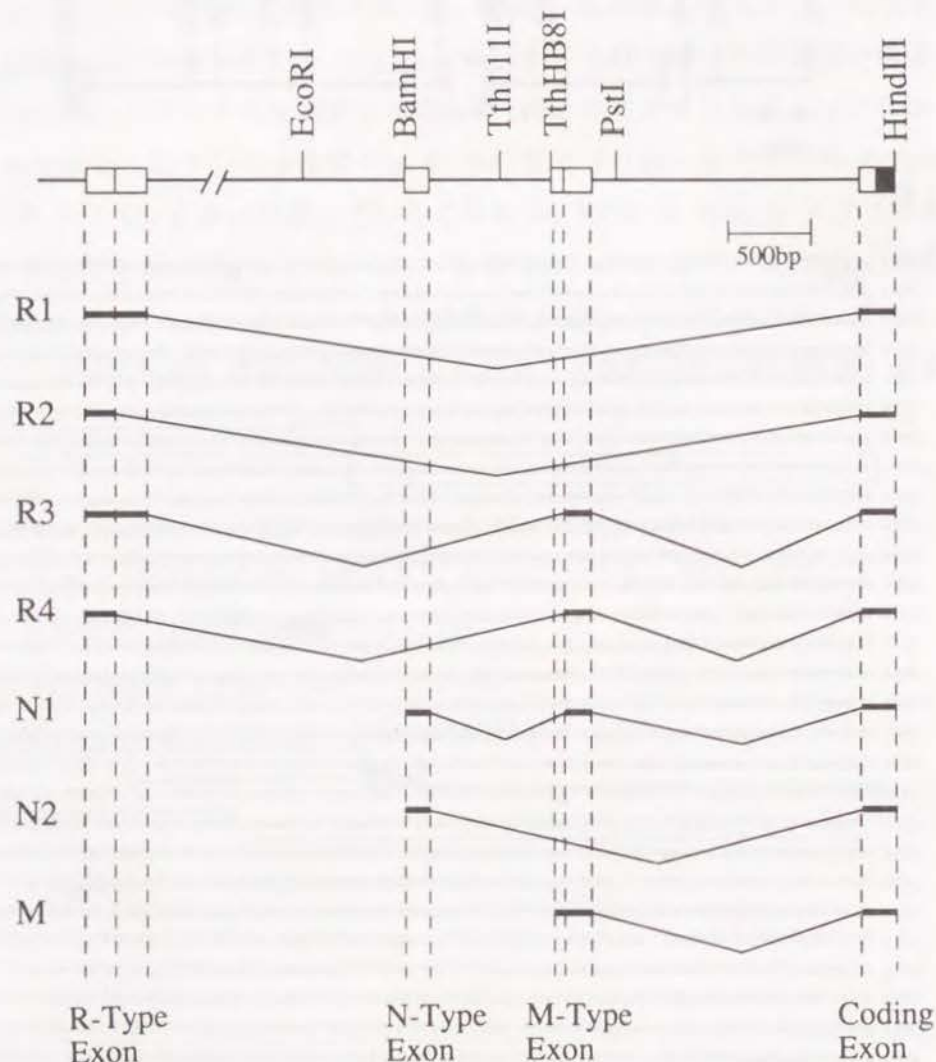


Fig. 12. Schematic diagram showing the splicing patterns of multiple choline acetyltransferase mRNA species from mouse spinal cord. Open and filled boxes indicate the 5'-noncoding and coding regions, respectively. Since R-type exon was not found in MG35 clone, it is positioned based on analogy to the rat choline acetyltransferase gene (Fig. 7).

4. マウス ChAT mRNA の 5'-RACE 解析

M-type エクソンを含む 4 種類の ChAT mRNA (R3、R4、N1 と M) のうち、どれが最も多量に発現しているかを 5'-RACE で解析した (Fig. 13)。マウス脊髄の poly(A)⁺RNA から RACE-1 primer で first strand cDNA を作成し、5'末端に dC-tail (15~20 bp) を付加した。second strand cDNA は (dG)₁₇-adaptor を用いて合成した。この cDNA を adaptor と RACE-2 primer (RACE-1 primer の上流に位置する) を用い PCR 法で増幅し、電気泳動で分離した。DNA をナイロンフィルターへ移行し ³²P でラベルした RACE-3 でハイブリダイズしたところ、130 bp (band-1) と 90 bp (band-2) の 2 本のバンドが検出された (Fig. 13A)。この 2 本のバンドを切り出し pUC18 にサブクローニングした。コロニーハイブリダイゼーションで band-1 を 3 クローン、band-2 を 5 クローン得て、塩基配列を決定した (Fig. 13B)。band-2 からのクローンはすべてスプライス部位の手前で停止していたが、band-1 からのクローンはスプライス部位をスプライスせずに越える M-type mRNA であった。

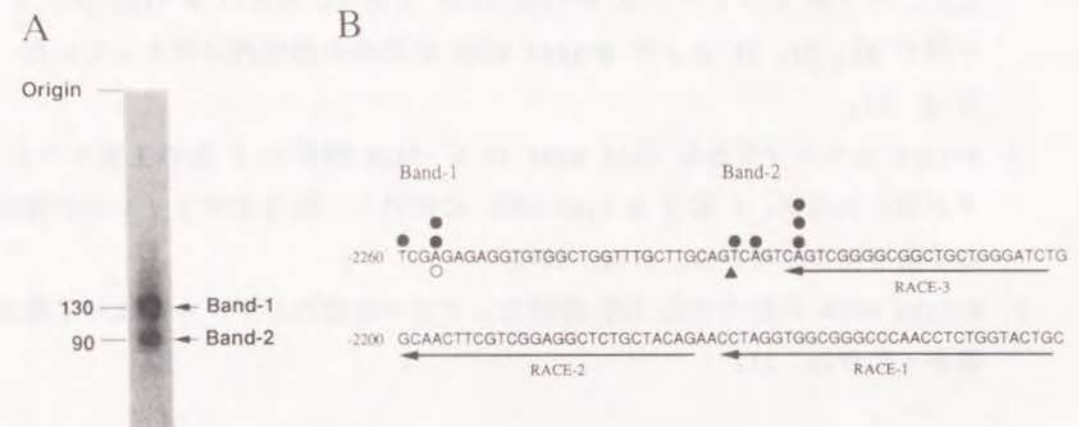


Fig. 13. 5'-RACE analysis of choline acetyltransferase mRNA species containing M-type exon. A, Poly(A)⁺RNA from the mouse spinal cord was reverse transcribed with a primer (RACE-1), and PCR amplification was performed with the second primer (RACE-2). The product was separated on a 3% agarose gel, blotted on a filter membrane and hybridized with the ³²P-labeled third primer (RACE-3). B, Identification of sequences of the 5'-end of 5'-RACE products. The filled circles indicate the position of the 5'-ends of RACE clones, and the open circle shows the 5'-end of cloned M-type cDNA (Fig. 8). The filled triangle indicates the splicing site within M-type exon (Fig. 11). Horizontal arrows indicate the position of primers used. Nucleotide residues are numbered as shown in Fig. 11.

マウス脊髄から 5' 非翻訳領域の異なる 7 種の ChAT mRNA を同定した。このうち 5 種はラット脊髄で同定した ChAT mRNA と同じ種類に属していたが、新たに R3、R4-type mRNA を得た。ゲノム DNA の解析からエクソン-イントロン構造とスプライシング様式はマウスとラットでほぼ等しいことが判明した。

R1-type mRNA 以外は initiation ATG codon の上流に in-frame で stop codon が確認された。R1-type mRNA の initiation ATG codon と推定される部位の上流にさらにオープンリーディングフレームが存在するか否かは今後の検討課題である。

7 種の ChAT mRNA のうち M-type mRNA が最も多量に発現していることは以下の知見から明らかである。

1. 単離した 21 クローンのうち 19 クローンが M-type エクソンを含んでいた。このうち 4 クローンは M-type cDNA であり、残りは M-type エクソン内の R3、R4、N1 および M-type mRNA に共通の領域内で停止していた (Fig. 8)。
2. M-type エクソンを含む ChAT mRNA の 5'-RACE 解析で 2 本の主要なバンドが得られたが、1 本は M-type mRNA に相当し、他はスプライシング部位の手前で停止していた。(Fig. 13)。
3. M-type mRNA に相当する PCR 産物のシグナルが他のシグナルに比べて最も強かった (Fig. 9)。

ゲノム DNA の EcoRI/HindIII 領域に多くの DNA エlement が認められた。これらが実際に機能しているか否かを明らかにするためには、レポーター遺伝子を用いた DNA トランスフェクション法などによる解析が必要である。第 2 編および第 3 編にマウス ChAT 遺伝子の機能解析について記す。

1. ラット脊髄から 5 種、マウス脊髄から 7 種の 5' 非翻訳領域の異なる ChAT mRNA を同定した。
2. ゲノム DNA の解析から、上記の ChAT mRNA は 3 カ所のプロモーター領域からの転写開始と、スプライシング部位の選択により産生することが判明した。
3. 複数の ChAT mRNA 分子種のうち、ラットおよびマウスの脊髄で M-type mRNA が最も多量に発現していた。

第 2 編

コリンアセチル転移酵素遺伝子のプロモーター領域 およびエンハンサー領域の同定

第 1 編において ChAT 遺伝子には 3 カ所のプロモーター領域が存在することを示したが、これを直接に証明するためには DNA トランスフェクション法などによるゲノム DNA の機能解析が必要である。ゲノム DNA の下流にレポーター遺伝子をつなぎ、培養細胞に導入してプロモーターやエンハンサー活性を測定した。培養細胞株はコリン作動性やアドレナリン作動性など、表現型の異なるさまざまな neuroblastoma が利用可能なマウスの cell line を用い、マウスの ChAT 遺伝子を解析した。

第 1 章

NS20Y および NG108-15 で発現している ChAT mRNA の解析

マウス由来で ChAT を発現している neuroblastoma cell line (NS20Y) と neuroblastoma & glioma hybrid cell line (NG108-15) の ChAT mRNA をノーザンブロットと PCR で解析した。

実験方法

1. ノーザンブロット解析

培養細胞から guanidium thiocyanate 法で total RNA を抽出した。20 μ g の total RNA を 1% formaldehyde-agarose gel で分離後、ナイロンフィルターへ移行した。プレハイブリダイゼーションは 50% formamide、1 M NaCl、10% dextran sulfate、1% SDS および 150 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA を含む溶液中で 42 $^{\circ}$ C、2 h 行った。上記溶液に 32 P でラベルした mouse ChAT cDNA の全長を 5×10^5 cpm/ml の濃度となる様に加え、42 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイゼーションした。その後フィルターは 2 x SSC で室温下、軽く 2 回すすいだのち、1% SDS を含む 0.2 x SSC 中で 60 $^{\circ}$ C、30 min 洗浄し、X線フィルムに露光した。

2. PCR とサザンブロット解析

第 1 編第 2 章と同様の方法を用いた。

実験結果

NS20Y と NG108-15 の ChAT mRNA をノーザンブロットで解析したところ、どちらの細胞も 4.0 kb の 1 本のバンドが検出された (Fig. 14A)。これはマウスの脊髄および脳で検出される ChAT mRNA と同じ長さであった⁵⁾。シグナルは NS20Y の方が強く、ChAT 活性の強さと相関していた (後述)。

PCR とサザンブロット解析では、第 1 編第 2 章に示した 7 種の ChAT mRNA

のうち、M-type mRNA のみが検出され、他の発現は微弱であった (Fig. 14B)。

考察

DNA トランスフェクション実験を行う前に、まず2種類のコリン作動性培養細胞株で発現している ChAT mRNA の解析を行った。ノーザンプロットでは脳や脊髄と同じ 4.0 kb のバンドが検出された。PCR 法による 25 回の増幅では 7 種の ChAT mRNA のうち M-type mRNA のみが検出され、他は検出限界以下であった。脊髄の poly(A)⁺RNA を用いたときは、同じ条件で 7 種の ChAT mRNA のすべてが検出されたこと (Fig. 9) を考慮すると、NS20Y と NG108-15 では M-type mRNA の発現が他の種類に比べて圧倒的に多いと考えられる。このため、これらのコリン作動性細胞は R-type mRNA や N-type mRNA の転写の解析には不向きであるが、M-type mRNA の転写解析には有用なモデルであると考えた。

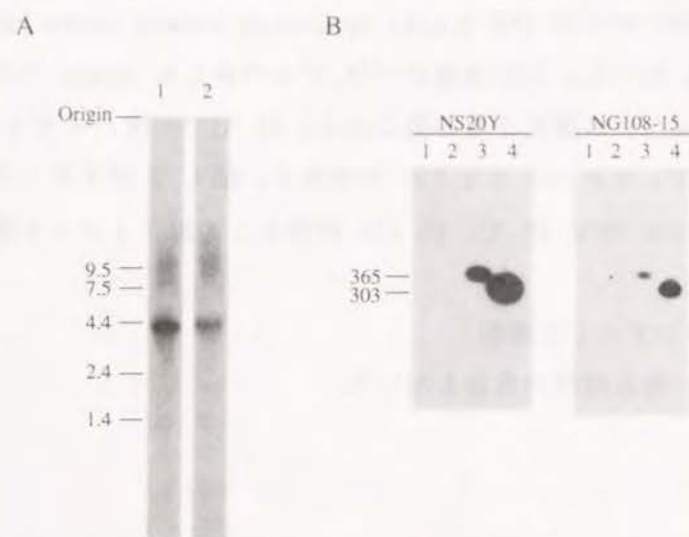


Fig. 14. Northern blot and PCR analysis of choline acetyltransferase mRNA expressed in cholinergic cell lines. A, Total RNAs (20 µg) prepared from NS20Y (lane 1) and NG108-15 (lane 2) cells were separated on a 1% formaldehyde-agarose gel, blotted on a filter membrane and hybridized with the ³²P-labeled mouse choline acetyltransferase cDNA. B, Poly(A)⁺ RNAs from the cells were analyzed by PCR with the specific forward primers and the common reverse primer. Primers used were; R (lane 1), N (lane 2), M-1 (lane 3), and M-2 (lane 4). The lengths of hybridization bands are shown on the left in bp. For autoradiography of NG108-15, a three times longer exposure was required compared to that for NS20Y cells.

第 2 章

DNA トランスフェクション法による ChAT の 5' 転写調節領域の解析

第 1 編第 2 章 でクローニングしたマウス ChAT の 5' 領域を含むゲノム DNA にレポーター遺伝子としてクロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) 遺伝子をつなぎ、本編第 1 章で解析した 2 種のコリン作動性細胞や、他の神経細胞や非神経細胞に導入してゲノム DNA のプロモーター活性を解析した。

実験方法

1. 発現プラスミドの作成

pSV2CAT²⁶⁾ の HindIII/BamHI (CAT unit、1651 bp) を Bluescript SK- (Stratagene) の HindIII/BamHI site に組み込んだ (pBlueCAT)。SV40 の poly(A)⁺付加シグナル (135 bp, HpaI/BamHI) を pSV2CAT から切り出し平滑末端にして、pBlueCAT の KpnI site (平滑末端化) に組み込んだ (pBlueOCAT)。Insert の向きは塩基配列により確認した。マウスのゲノム DNA クローン (MG35) の EcoRI (平滑末端化)/HindIII (4054 bp) を pBlueOCAT の HincII/HindIII site に組み込みこんだ。続いて HindIII で切断し、平滑末端化後に Xba linker (5'-CTCTAGAG-3') を挿入した (pBlueOEHCAAT)。この construct は ChAT の initiation ATG codon の下流に inframe で stop codon (TAG) を配置することで、レポーター (CAT) タンパク質の翻訳が自身の ATG codon から始まる様にしたものである。pBlueOEHCAAT から XhoI/Tth111I と XhoI/PstI を切り取り平滑末端化後に self-ligation し、それぞれ pBlue0THCAAT と pBlue0PHCAAT を得た。pBlue0TTCATの作成は MG35 の Tth111I/TthHB8I を平滑末端化し、pBlueOCAT の ClaI site を平滑末端化して組み込んだ。以上の CAT 発現ベクターの作成に使用した制限酵素 site を Fig. 11B に示した。

2. 細胞培養とDNAトランスフェクション

細胞は 10% fetal calf serum を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で

37 °C、7% CO₂ 存在下で培養した。ただし NIH3T3 は fetal bovine serum の代わりに 10% bovine calf serum を用い、NG108-15 には 1 x HAT 液 (100 μM hypoxanthine、0.4 μM aminopterin、16 μM thymidine) を追加した。DNA トランスフェクションはリン酸カルシウム法²⁷⁾で行い、6-cm dish (5 x 10⁵ cells) あたり 5 μg の CAT 発現プラスミド、4 μg の carrier DNA (Bluescript) と 1 μg の internal control プラスミド (pactβ-gal²⁸⁾) を用いた。DNA を加えた 4 時間後にグリセロールショックを行い、さらに 63-66 h 培養した。細胞は回収したのち、150 μl の 250 mM Tris-Cl (pH 8.0) 中で超音波で破碎した。

3. 各種酵素活性の測定

β-ガラクトシターゼ活性は 0-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside を基質として測定した²⁹⁾。CAT 活性は [1-¹⁴C] chloramphenicol (57 mCi/mmol) を基質とし、5-20 μg のタンパク質で 37 °C、30 min 反応させ²⁷⁾、アセチル化産物は TLC で分離した。放射活性の絶対値は Ambis Radioanalytic Imaging System を用いて測定した。ChAT 活性は Fonnum の方法³⁰⁾により測定した。

実験結果

1. コリン作動性細胞での M-type mRNA プロモーターの解析

DNA トランスフェクションのためのベクターとして Bluescript の multiple cloning site に CAT unit を挿入した (pBlueCAT)。このベクターを細胞に導入し CAT 活性を測定したが、バックグラウンドの転写が強く、プロモーター活性の評価が困難であった。そこで CAT unit の上流に poly(A)⁺付加シグナルを挿入したところ (pBlueOCAT)、バックグラウンドの転写は 1% 以下となった。各種ゲノム断片は、この poly(A)⁺付加シグナルと CAT unit の間に挿入した (Fig. 15)。ポジティブコントロールとして用いた pSV2CAT の発現は、NS20Y と NG108-15 においてそれぞれ 3.20 と 1.06% substrate acetylation/μg protein/30 min であった。EcoR I/HindIII 領域を含む pBlueOEHCAT は両方の細胞で高いプロモーター活性を示した。pBlueOEHCAT の -4060 から -2752 (EcoR I/Tth111 I) を欠失させ

た時 (pBlueOTHCAT)、プロモーター活性は NS20Y で 1.7 倍、NG108-15 で 1.9 倍の増加が観察された。この結果は、EcoR I/Tth111 I にサブレッサーエレメントが存在するか、もしくは転写を弱める構造上の障壁があることを示している。さらに -1823 bp (Pst I) まで欠失させた時 (pBlueOPHCAT)、プロモーター活性はバックグラウンドレベルまで低下した。また、M-type エクソン上流の TATA-box 様の配列を含む -2751 から -2259 bp (Tth111 I/TthHB8 I) 領域を挿入した時 (pBlueOTTCAT)、有意なプロモーター活性が認められた。

以上から、Tth111 I/TthHB8 I にプロモーターが存在し、TthHB8 I/HindIII にエンハンサー様活性があることが示された。

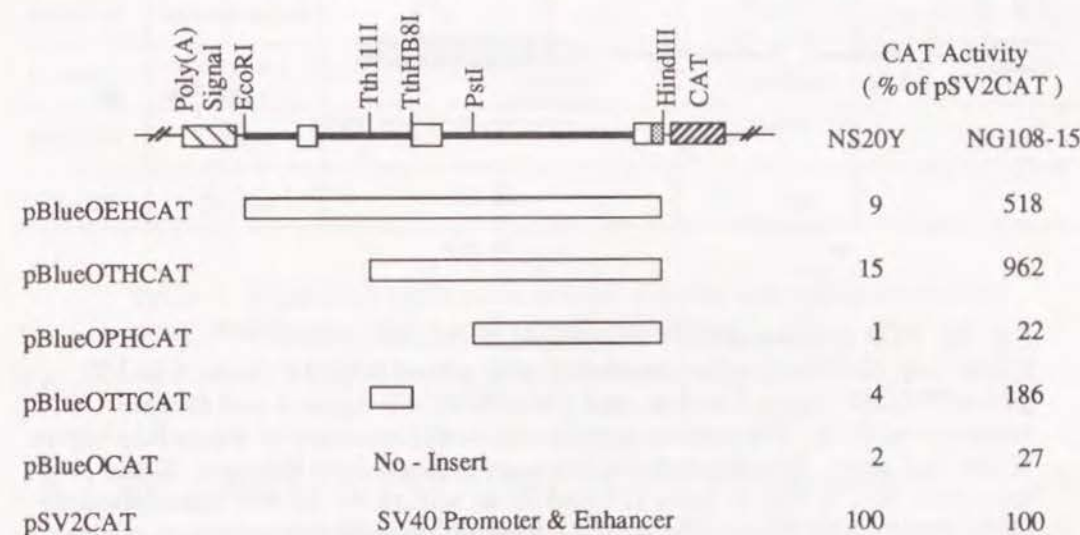


Fig. 15. Transient CAT assay in cholinergic cell lines. The structure and restriction enzyme sites of the 5'-noncoding and coding regions are the same as those shown in Fig. 11. The open boxes indicate the regions of choline acetyltransferase gene inserted into the CAT expression plasmid. CAT activity is given as a percentage of that in the cells transfected with pSV2CAT. Duplicate transfections were performed in each experiment, and the values are the means of two independent experiments.

2. レポーター (CAT) mRNA の PCR 解析

トランスフェクションした DNA の転写が細胞内で正しく行われているか否かを PCR 法を用いて解析した (Fig. 16)。

各プラスミドを導入した細胞から total RNA を抽出し、CAT の翻訳領域 (+20 ~ +41) に相補的な reverse primer と M-type エクソン内 (Fig. 8、M-1) もし

くは M-type プロモーターの TATA-box 様配列の上流の forward primer を用いて PCR 法で増幅し、サザンブロッティングを行った。M-type エクソン内の primer を用いた時に、pBlueOEHCAT と pBlueOTHCAT を導入した細胞で正しいスプライシングを受けた長さに相当する 384 bp のバンドが認められた。一方、上流の primer を用いた時にはいずれの細胞でもバンドが検出されなかった。この結果は、トランスフェクションした DNA の転写が M-type プロモーターから始まり、かつ転写産物が正しくスプライシングを受けていることを示している。

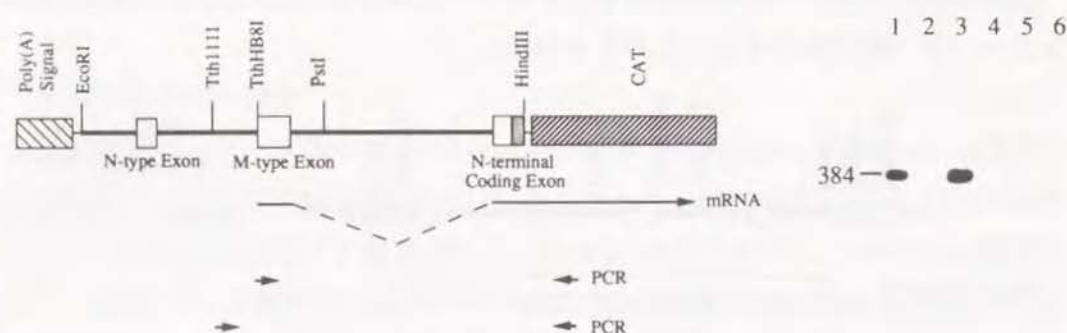


Fig. 16. PCR analysis of CAT transcripts in NG108-15 cells. RNAs from NG108-15 cells transfected with pBlueOEHCAT (lanes 1 and 2), pBlueOTHCAT (lanes 3 and 4), and pBlueOPHCAT (lanes 5 and 6) were analyzed by PCR. The reverse primer was complementary to the coding region of the CAT gene. The forward primers were selected from the most 5'-end of M-type exon (M-1 in Fig. 8, lanes 1, 3 and 5), as well as the 22-mer oligonucleotide (5'-CTTACTGTGGCCAACCAACTCC) located immediately upstream of the TATA box-like sequence (lanes 2, 4 and 6). The products were separated on a 2.5% agarose gel and analyzed by Southern hybridization as in Fig. 9.

3. 各種培養細胞を用いたプロモーター活性の解析

EcoRI/HindIII 領域に ChAT の神経細胞特異的発現を規定する DNA エLEMENT が含まれているか否かを検討するため、Table 1 に示したマウス由来の各種培養細胞に pBlueOEHCAT と pBlueOTTCAT を導入し、CAT 活性を測定した。また各細胞の内在性 ChAT 活性も測定した (Table 1)。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして、それぞれ pSV2CAT と pBlueOCAT を用いた。pSV2CAT はすべての細胞で強い発現がみられた。pBlueOEHCAT の発現は NG108-15 で強く、NS20Y と N18TG1 で中程度に発現したが非神経細胞での発現はバックグ

ランドと同程度であった。pBlueOTTCAT は pBlueOEHCAT に比べると発現はかなり低くなるものの、3 種の神経由来の細胞では有意な発現が検出された。一方、これらの神経細胞において、レポーター (CAT) 活性と内在性 ChAT 活性との相関は認められなかった。

Cell Lines	Origin	CAT Activity (% of pSV2CAT)			Choline Acetyltransferase Activity (pmol/mg protein/min)
		pBlueOCAT	pBlueOEHCAT	pBlueOTTCAT	
NS20Y	Neuroblastoma	2	10	5	262
NG108-15	Neuroblastoma & Glioma	24	499	220	188
N18TG1	Neuroblastoma	5	19	15	12
L Cells	Connective tissue	3	4	3	<1
Balb/3T3	Embryo	<1	2	1	<1
NIH/3T3	Embryo	2	2	1	<1

Table 1. Transient expression of CAT activity and intrinsic choline acetyltransferase activity in various cell lines.

考察

第 1 編第 2 章に示したマウスの ChAT 遺伝子の 5' 領域の塩基配列で N および M-type エクソンの上流に TATA-box 様の配列が認められた。プロモーターの存在を直接に証明するためには、レポーター遺伝子を用いる DNA トランスフェクション法か核抽出液を用いる in-vitro transcription assay などを行う必要がある。著者は 内在性 ChAT 活性が検出される neuroblastoma cell (NS20Y) と neuroblastoma & glioma hybrid cell (NG108-15) を用い、DNA トランスフェクション法でクローン化した ChAT のゲノム領域のプロモーター活性の検討を試みた。まずこれらの細胞での ChAT mRNA の転写様式を調べたところ、M-type mRNA の発現が圧倒的に強く、他の発現は微弱であった。従って上記の細胞は M-type mRNA のプロモーターを解析する上では有用であろうと考えた。実際、本実験で N-type エクソン上流の TATA-box を含む領域の欠失はプロモーター活性を消失させるどころか、むしろプロモーター活性を強めた。この結果は、著者の用いた

2 種のコリン作動性細胞では N-type mRNA のプロモーターはほとんど機能していないことを示している。現在までのところ、M-type 以外の ChAT mRNA 分子種を主に発現する細胞株は知られていない。

著者は DNA トランスフェクション法により、M-type mRNA のプロモーターを Tth111 I/TthHB8 I 領域に同定した。また、この領域のプロモーター活性は下流に M-type エクソンおよびイントロンがつながって存在しているときに増強された。この原因としては、① TthHB8 I/HindIII 領域にエンハンサーエレメントが存在する、② native なエクソン-イントロン構造が効率のよい転写開始に必要である、との 2 つの可能性が考えられる。TthHB8 I/HindIII 領域の転写増強メカニズムは今後の重要な課題であると考えられる。

本編の結果は、著者のクローニングした ChAT 遺伝子の 5' 領域には ChAT の神経細胞での特異的発現を規定する情報が含まれていることを示している。しかし、神経細胞間での内在性 ChAT 遺伝子の発現とトランスフェクションしたレポーター遺伝子 (CAT) の発現との間には相関が見られなかった。この結果はクローン化した領域 (EcoR I/HindIII) には ChAT の神経特異的発現を規定するエレメントは存在するが、コリン作動性特異的発現を規定するエレメントは存在しないことを示しているのかもしれない。あるいはこの領域にはコリン作動性特異的発現を規定するエレメントが実際には存在するが、各細胞での内在性 ChAT 活性が転写因子以外のファクター (遺伝子構造の変異など) により決定されているため、見かけ上相関性を示さなかったと考えることもできる。いずれにせよ、さらに多くの細胞株やトランスジェニックマウスを用いた解析により、ChAT のコリン作動性特異的発現のメカニズムが明らかになることが期待できる。

第 2 編 小括

1. 2 種類のコリン作動性細胞 (NS20Y と NG108-15) は M-type mRNA を他の種類に比べ圧倒的に多く発現しているため、M-type mRNA のプロモーターを解析するための有用なモデルである。
2. マウスの ChAT 遺伝子の Tth111 I/TthHB8 I 領域に M-type mRNA のプロモーターを同定した。また、TthHB8 I/HindIII 領域にエンハンサー様活性を認めた。
3. M-type mRNA のプロモーターおよびその下流のイントロンには ChAT の神経細胞特異的発現を規定する領域があることが判明した。

第3編

サイクリック AMP によるコリンアセチル転移酵素遺伝子の転写調節

サイクリック AMP (cAMP) 誘導体や細胞内の cAMP 濃度を増加させる各種薬物が neuroblastoma cell や初代培養神経細胞の ChAT 活性を増加させることが知られている^{31, 32, 33, 34})。しかしこの ChAT 活性の増加が、ChAT 遺伝子の転写レベルでの増加によるものか、ChAT タンパク質のリン酸化等の翻訳後修飾によるものか、そのメカニズムは明らかではない。

第1編第2章に示したマウスの ChAT 遺伝子上には cAMP 反応性エレメント (CRE) に類似の配列が認められた。そこで著者は NG108-15 を用い、クローン化した ChAT 遺伝子の cAMP 反応性を検討した。

実験方法

PCR とサザンブロット解析は第1編第2章に、ノーザンブロット解析は第2編第1章に、細胞培養と発現プラスミドの作成および各種酵素活性の測定は第2編第2章にそれぞれ記した方法に準じた。

DNA トランスフェクションは 6-cm dish (5×10^5 cells) あたり $2 \mu\text{g}$ の CAT 発現プラスミドと $3 \mu\text{g}$ の carrier DNA (Bluescript) を用い、第2編第2章の方法で行った。グリセロールショックの 15 h 後に、培地を交換し各種薬物を添加してさらに 48 h 培養した。

Stable cell line の樹立は、Sac I で切断した pBlueOEHCAT $12.5 \mu\text{g}$ と pSV2neo $2.5 \mu\text{g}$ とを co-transfection し、グリセロールショックの 48 h 後に細胞を集め、 1 mg/ml の G418 を含む培地に交換して 10-cm dish にまき直した。2 週間の培養の後に G418-resistant なコロニーを選択した。

実験結果

1. Dibutyryl cAMP (DBcAMP) による NG108-15 の ChAT mRNA の増加

DBcAMP (5 mM ; 予備実験による最適濃度) 存在下および非存在下で 48 h 培養した NG108-15 から total RNA を抽出し、ChAT の発現をノーザンブロットで解析した (Fig. 17)。 4.0 kb の ChAT mRNA のシグナルは DBcAMP 投与により約 2 倍に増加した。下記に示す通り、この増加の程度は同じ条件で培養した細胞の ChAT 活性の増加の程度と良く一致していた。

DBcAMP 非存在下、 $94 \pm 6 \text{ pmol/mg protein/min}$ ($n=3$)

DBcAMP 存在下、 $177 \pm 5 \text{ pmol/mg protein/min}$ ($n=3$)

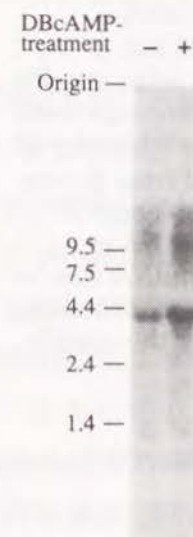


Fig. 17. Northern blot analysis. Total RNA ($20 \mu\text{g}$) prepared from NG108-15 cells cultured for 48 h in the absence (-) or presence (+) of 5 mM DBcAMP was separated on a 1% formaldehyde-agarose gel, blotted on a filter membrane and hybridized with the ^{32}P -labeled mouse choline acetyltransferase cDNA.

2. DBcAMP で増加する ChAT mRNA 分子種の PCR 解析

第1編第2章に示した 7 種の ChAT mRNA のうち、DBcAMP 投与でどの分子種の転写が増加するのかを PCR 法で解析した (Fig. 18AB)。DBcAMP 非存在下では第2編第1章の結果と同様に、M-type mRNA のみが検出された。DBcAMP (5 mM) 投与により M-type mRNA のほか、R1、R2、N2-type mRNA も検出されたが、発現は M-type mRNA が最も強かった。この結果は、NG108-15 においては DBcAMP の存在、非存在にかかわらず、M-type mRNA が最も効率よく転写されていることを示している。

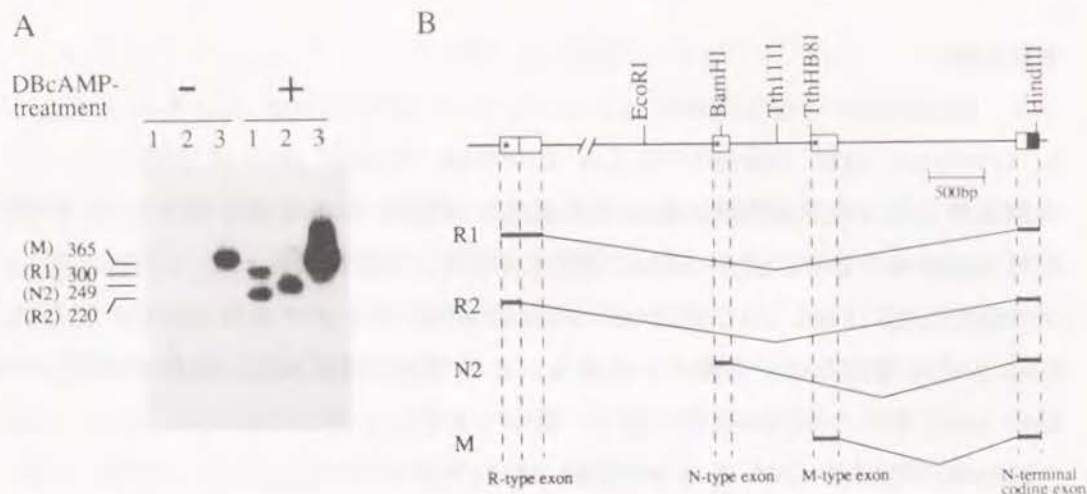


Fig. 18. PCR amplification of the 5'-region of choline acetyltransferase mRNA. Total RNA from NG108-15 cells cultured in the absence (-) or presence (+) of 5 mM DBcAMP was PCR-amplified for 25 cycles using specific forward primers and a common reverse primer. The products were separated on a 3% agarose gel, and transferred to a filter membrane and hybridized with a ^{32}P -labeled oligonucleotide. Specific primers used were selected from R-type exon (lane 1), N-type exon (lane 2) and M-type exon (lane 3). The length of hybridization bands are shown on the left in bp with the type of mRNA in parentheses. B, Splicing patterns of choline acetyltransferase mRNA species detected in the PCR analysis. Open and filled boxes indicate the 5'-noncoding exons and the N-terminal coding exon, respectively. Positions of the specific primers are shown by asterisks.

3. DNA トランスフェクション法による ChAT ゲノム DNA の cAMP 反応性の検討

第 2 編第 2 章で示したマウスの ChAT 遺伝子の EcoRI/HindIII 領域の下流に CAT unit をつないだプラスミド (pBlueOEHCAT) を NG108-15 と L cell にトランスフェクションし、cAMP 誘導体の投与によりレポーター遺伝子の発現が増加するか否かを検討した。EcoRI/HindIII 領域には CRE に類似の配列 (TGACCTCA) が M-type エクソンの下流に位置するイントロンに認められた (第 1 編第 2 章)。pBlueOEHCAT をトランスフェクションした翌日に培地に DBcAMP、8-Bromo cAMP (8-BrcAMP) または prostaglandin E_1 + theophylline を加え 48 h 後に CAT 活性を測定した (Table 2)。第 2 編第 2 章に記した通り、cAMP 誘導体非存在下における pBlueOEHCAT の発現は L cell に比べ NG108-15 で約 50 倍強力であった。DBcAMP 投与はレポーター遺伝子の発現を顕著に (約 10 倍)

増加させたが、8-BrcAMP は同じ濃度において約 2 倍上昇させたにすぎなかった。DBcAMP は細胞膜を透過したのち細胞内で分解して butyrate を放出することが知られている³⁶⁾。また、sodium butyrate は単独でレポーター遺伝子の発現を約 4 倍に増加した。この結果は DBcAMP の劇的な効果が cAMP と butyrate の相加効果であることを示している。一方、prostaglandin E_1 + theophylline 投与は細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、NG108-15 と横紋筋とのシナプス形成を著しく促進することが知られている³⁶⁾。prostaglandin E_1 + theophylline 投与は vehicle に比べレポーター遺伝子の発現を 2 倍に増加させた。

以上の薬物は L cell においても有効であった (Table 2)。この結果は、トランジェントなトランスフェクション解析では、内在性の ChAT を発現しない細胞においても、外から導入した ChAT 遺伝子の転写を cAMP が促進しうることを示している。この様なトランジェントな系での cAMP の有効性は、ソマトスタチン遺伝子や、チロシン水酸化酵素遺伝子などでも示されている^{37, 38)}。

次に、EcoRI/HindIII 領域のうち cAMP 反応性にはどの領域が必須であるかを、部分的に欠失したプラスミドを用いて検討した。pBlueOEHCAT、pBlueOTHCAT および pBlueOTTCAT の 3 種のプラスミドを NG108-15 に導入し、DBcAMP 存在下、非存在下で培養し CAT 活性を測定した (Fig. 19)。pBlueOEHCAT と pBlueOTHCAT は DBcAMP によりそれぞれ 10.9 倍と 8.3 倍に発現が増大した。一方、pBlueOTTCAT では 3.6 倍の上昇が観察されたが、これは butyrate による上昇 (3.9 倍、Table 2) と同程度であった。

Drug (conc.)	CAT Activity (fold-increase)	
	NG108-15	L cell
DBcAMP (1 mM)	6.0 ± 0.2	-
DBcAMP (5 mM)	10.1 ± 0.6	3.2 ± 0.4
8-BrcAMP (1 mM)	2.0 ± 0.5	-
8-BrcAMP (5 mM)	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3
Sodium Butyrate (10 mM)	3.9 ± 0.4	1.3 ± 0.1
Vehicle (0.4 % Ethanol)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Prostaglandin E_1 (4 μM) & Theophylline (1 mM)	2.6 ± 0.1	3.1 ± 0.1

Table 2. Effects of cAMP derivatives, sodium butyrate, and prostaglandin E_1 plus theophylline on transient expression of pBlueOEHCAT. Values are the mean fold increase ± SEM (n=3).

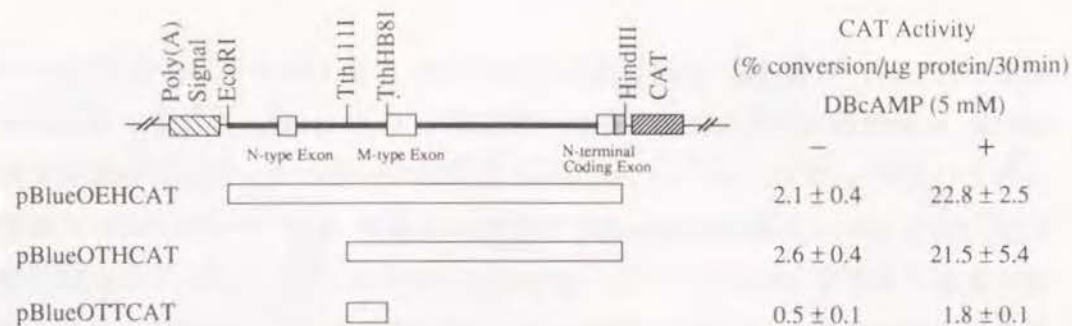


Fig. 19. Transient CAT assay using partially deleted DNA constructs. The open boxes indicate the region of choline acetyltransferase gene inserted into the CAT expression plasmid. Transient transfection and treatment with DBcAMP were conducted. CAT activity was analyzed 48 h after the addition of 5 mM DBcAMP and is given as mean ± SEM (n=3).

4. stable cell line での DBcAMP 反応性の検討

EcoRI/HindIII 領域に内在性 ChAT 遺伝子の cAMP 反応性を規定するのに十分なエレメントが含まれているか否かを stable cell line を樹立して検討した。

pBlueOEHCAT と pSV2neo を co-transfection して G418 で選択し、stable cell line を樹立した。DBcAMP (5 mM) 投与後 0、48、96 h 後に、内在性 ChAT 活性とレポーター遺伝子 (CAT) 活性をそれぞれ測定した (Fig. 20)。DBcAMP による活性の増加は両者ではほぼ同程度 (2 ~ 3倍) であった。

stable cell line では外から導入した DNA は細胞の遺伝子に組み込まれて発現している。この状態でのレポーター遺伝子の発現が、時間的にも、強度においても、内在性 ChAT 遺伝子の発現と一致したことは、EcoRI/HindIII 領域に ChAT 遺伝子の cAMP 反応性を規定するのに十分なエレメントが含まれていることを示している。

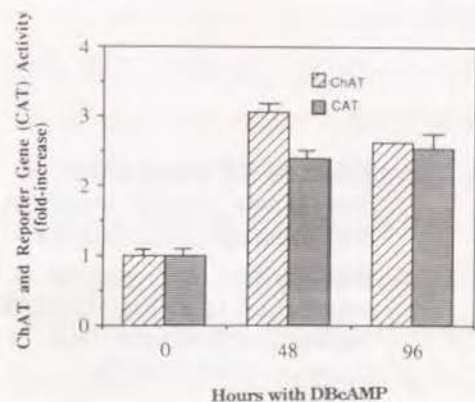


Fig. 20. Effect of DBcAMP on choline acetyltransferase and reporter gene (CAT) activity in stably transfected NG108-15. NG108-15 cells were stably transfected with pBlueOEHCAT and pSV2neo. A stable cell line was seeded at a density of 5×10^5 cells in a 60-mm dish. Both choline acetyltransferase and CAT activities were determined at 0, 48 and 96 h after the addition of 5 mM DBcAMP. Values are the fold-increase ± SEM compared with at time 0 activity, calculated from triplicate cultures.

考察

さまざまな細胞で cAMP 誘導体や細胞内 cAMP 濃度を増加させる薬物が ChAT 活性を上昇させることが示されているが^{31, 32, 33, 34}、そのメカニズムは明らかではない。著者は cAMP による NG108-15 での ChAT 活性の増加が ChAT mRNA の転写の増加に由来するのか、または ChAT タンパク質のリン酸化等の翻訳後修飾に由来するのかを検討した。ノーザンブロット解析での ChAT mRNA のシグナルの DBcAMP による増加 (2.0 倍) は ChAT 活性の増加 (1.9 倍) の程度と良く一致していた。この結果は DBcAMP が ChAT 遺伝子の転写を高めるか、もしくは ChAT mRNA の安定性を高めることを示している。この可能性のうち、著者は DNA トランスフェクション法による解析で、DBcAMP 投与による ChAT 活性の増加が ChAT 遺伝子の転写の増加に基づくことを証明した。Bruce and Hersch⁷¹ は、ヒト胎盤から部分精製した ChAT は calcium/calmodulin-dependent protein kinase や calcium/phospholipid-dependent protein kinase によりリン酸化を受けるが、cAMP-dependent protein kinase (A kinase) によってはリン酸化されないと報告している。したがって、cAMP が A kinase を活性化し、ChAT タンパク質をリン酸化することにより活性を上昇させている可能性は低い。また、いずれのタンパク質リン酸化酵素を介するにせよ、リン酸化により ChAT の活性上昇がおけるとの報告はまだない。

トランジェントなトランスフェクション解析で DBcAMP と 8-BrcAMP の効果の強度には顕著な違いが見られた。DBcAMP は細胞膜を透過したのちに分解して butyrate を放出することが知られている³⁵。また butyrate はトランスフェクションの効率を高め、外から加えた遺伝子を発現する細胞の数を増やすことが知られており、実際にこの目的のために使用されることもある³⁹。さらに著者の結果では butyrate 自身には ChAT の転写を高める働きは認められなかった。したがって DBcAMP でみられる劇的な効果が cAMP の効果と butyrate のトランスフェクションの効率に対する効果の相加効果である可能性が高い。実際 butyrate の単独効果を調べたところ、トランジェントな系において、レポーター遺伝子の発現を 4 倍に増加させた。また DBcAMP はトランジェントな系ではレポーター遺伝子の発現を約 10 倍に増大させたが、トランスフェクションの効率が影響しな

いスティブルな系ではその効果は 8-BrcAMP の効果と同程度の 2~3 倍であった。

本編の結果は M-type エクソンの下流に位置するイントロン領域が CRE 類似の配列を含み、これが ChAT 遺伝子の cAMP 反応性に必須であることを示している。しかしながら現在のところ、この CRE 様配列が実際に機能しているか否かは断定できない。cAMP が ChAT 遺伝子の発現に関与する他の転写調節因子 (CRE-binding protein 以外) の転写を高め、その結果として二次的に ChAT 遺伝子の発現が高まっている可能性も否定できない。いずれにしても著者の同定したイントロン領域の詳細な解析により ChAT 遺伝子の cAMP 反応性のメカニズムが明らかになることが期待できる。

第 3 編 小括

1. NG108-15 での cAMP による ChAT 活性の増加は、ChAT 遺伝子の転写の増加に基づくことを明らかにした。
2. ChAT 遺伝子の cAMP 反応性を規定するエレメントは M-type エクソンの下流に位置するイントロン領域に存在する。

結 論

著者はコリンアセチル転移酵素の遺伝子発現機構に関する研究を行い、以下の知見を得た。

1. ChAT の mRNA には 5' 非翻訳領域の異なる複数の分子種（ラットで 5 種、マウスで 7 種）が存在し、それらは 3 カ所のプロモーターからの転写開始とスプライシング部位の可変的選択の組合せにより産生する。
2. 脊髄および 2 種のコリン作動性培養細胞で最も発現量の多い M-type mRNA のプロモーター領域をマウスの ChAT 遺伝子の Tth111 I / TthHB8 I 領域に同定した。また TthHB8 I / HindIII 領域にエンハンサー様活性を認めた。
3. M-type mRNA のプロモーターおよびその下流のイントロンには ChAT の神経細胞特異的発現を規定する領域が存在する。
4. ChAT 遺伝子の転写は、細胞内の cAMP 濃度の上昇により増加する。この cAMP 反応性に必須の領域は TthHB8 I / HindIII 領域である。

以上の知見は ChAT 遺伝子の発現調節機構を明らかにするとともに、コリン作動性ニューロンの発生、分化および変性の機構を研究する上での基礎を提供するものである。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学薬学部 佐藤公道教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文は（財）東京都神経科学総合研究所 分子神経生物学研究部門および神経学研究部門で行った研究をまとめたものです。本研究を行う機会をお与えくださり、終始直接の御指導と御鞭撻を賜りました 出口武夫参事研究員に心から感謝の意を表します。

また、共同研究者であり本研究に御協力と御助言を賜りました（財）東京都神経科学総合研究所 高橋良輔研究員、石井加代子研究員、および 東京大学 見学美根子修士に深く感謝いたします。

最後に、さまざまな御援助を賜りました 嶋津浩所長、土倉美智子氏をはじめ（財）東京都神経科学総合研究所の皆様は厚く御礼申し上げます。

発表論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

- 1) Misawa, H., Ishii, K., and Deguchi, T.
"Gene expression of mouse choline acetyltransferase:
Alternative splicing and identification of a highly active
promoter region."
J. Biol. Chem. **267**, 20392-20399 (1992)
- 2) Misawa, H., Takahashi, R., and Deguchi, T.
"Transcriptional regulation of choline acetyltransferase gene by
cyclic AMP."
J. Neurochem. **60**, 1383-1387 (1993)
- 3) Kengaku, M., Misawa, H., and Deguchi, T.
"Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat
spinal cord."
Mol. Brain Res. **18**, 71-76 (1993)

引用文献

- 1) Nachmansohn, D., and Machado, A. L. (1943) *J. Neurophysiol.* **6**, 397-403
- 2) Itoh, N., Slemmon, J. R., Hawke, D. H., Williamson, R., Morita, E., Itakura, K., Roberts, E., Shively, J. E., Crawford, G. D., and Salvaterra, P. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4081-4085
- 3) Berrard, S., Brice, A., Lottspeich, F., Braun, A., Barde, Y.-A., and Mallet, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9280-9284
- 4) Brice, A., Berrard, S., Raynaud, B., Ansieau, S., Coppola, T., Weber, M. J., and Mallet, J. (1989) *J. Neurosci. Res.* **23**, 266-273
- 5) Ishii, K., Oda, Y., Ichikawa, T., and Deguchi, T. (1990) *Mol. Brain Res.* **7**, 151-159
- 6) Oda, Y., Nakanishi, I., and Deguchi, T. (1992) *Mol. Brain Res.* **16**, 287-294
- 7) Bruce, G., and Hersh, L. B. (1989) *Neurochem. Res.* **14**, 613-620
- 8) Salvaterra, P. M., and Vaughn, J. E. (1989) *Int. Rev. Neurobiol.* **31**, 81-143
- 9) Giller, E. L. Jr., Schrier, B. K., Shainberg, A., Fisk, H. R., and Nelson, P. G. (1973) *Science* **182**, 588-589
- 10) Patterson, P. H. (1978) *Annu. Rev. Neurosci.* **1**, 1-17
- 11) Yamamori, T., Fukada, K., Aebersold, R., Korsching, S., Fann, M.-J., and Patterson, P. H. (1989) *Science* **246**, 1412-1416
- 12) Hughes, J. T. (1982) *Advances in Neurology: Human Motor Neuron Diseases*, vol. 36, pp. 61-74, Raven Press, New York
- 13) Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., and DeLong, M. R. (1982) *Science* **215**, 1237-1239
- 14) Aviv, H., and Leder, P. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 1408-1412

- 15) Land, H., Gretz, H., Hauser, H., Lindenmeier, W., and Schütz, G. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 2251-2266
- 16) Huynh, T. V., Young, R. A., and Davis, R. W. (1985) *DNA cloning: A Practical Approach* (Glover, D. M. ed) vol. 1 pp. 49-78, IRL Press, Washington DC
- 17) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. pp. 9.14-9.30, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- 18) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467
- 19) Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., and Kaplan, J-C. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187**, 691-698
- 20) Breathnach, R., and Chambon, P. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383
- 21) Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8998-9002
- 22) Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin M. (1987) *Cell* **49**, 729-739
- 23) Lee, W., Mitchell, P., and Tjian R. (1987) *Cell* **49**, 741-752
- 24) Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., and Goodman, R. H. (1986) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6682-6686
- 25) Sen, R., and Baltimore, D. (1986) *Cell* **47**, 921-928
- 26) Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1051
- 27) Rosenthal, N. (1987) *Methods Enzymol.* **152**, 704-720
- 28) Inagaki, N., Maekawa, T., Sudo, T., Ishii, S., Seino, Y., and Imura, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1045-1049
- 29) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. pp. 16.59-16.67, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- 30) Fonnum, F. (1975) *J. Neurochem.* **24**, 407-409
- 31) Brenneman, D. E., and Warren, D. (1983) *J. Neurochem.* **41**, 1349-1356
- 32) Szutowicz, A., Morrison, M. R., and Srere, P. A. (1983) *J. Neurochem.* **40**, 1664-1670
- 33) Kirshner, J. A., Markelonis, G. J., and Max, S. R. (1986) *J. Neurochem.* **46**, 817-821
- 34) Zurn, A. D. (1990) *Dev. Biol.* **140**, 53-56
- 35) Kaukel, E., and Hilz, H. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1011-1018
- 36) Nirenberg, M., Wilson, S., Higashida, H., Rotter, A., Krueger, K., Busis, N., Ray, R., Kenimer, J. G., and Adler, M. (1983) *Science* **222**, 794-799
- 37) Powers, A. C., Tedeschi, F., Wright, K. E., Chan, J. S., and Habener, J. F. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10048-10056
- 38) Huang, Z., Thewke, D., Gong, Q., Schlichter, D., and Wicks, W. D. (1991) *Mol. Brain Res.* **11**, 309-319
- 39) Gorman, C. (1985) *DNA cloning: A Pratical Approach* (Glover D. M. ed) vol. 2, pp. 143-190, IRL Press, Washington DC